

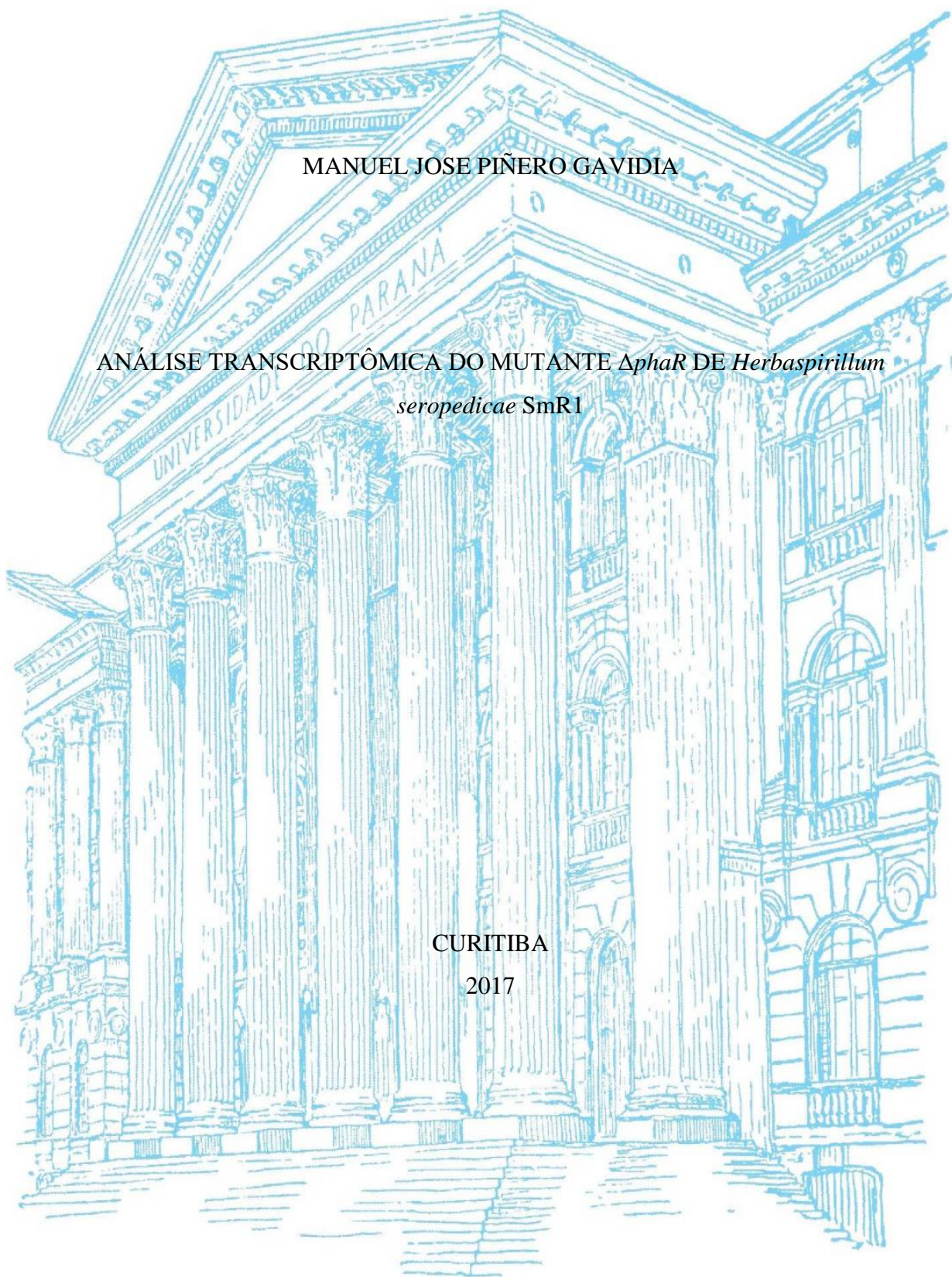
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANUEL JOSE PIÑERO GAVIDIA

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO MUTANTE ΔphaR DE *Herbaspirillum*
seropedicae SmR1

CURITIBA

2017



MANUEL JOSE PIÑERO GAVIDIA

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO MUTANTE $\Delta phaR$ DE *Herbaspirillum*
seropedicae SmR1

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
(Bioquímica) pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências (Bioquímica) do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu

CURITIBA 2017

TERMO DE APROVAÇÃO

MANUEL JOSE PIÑERO GAVIDIA

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO MUTANTE Δ phaR DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

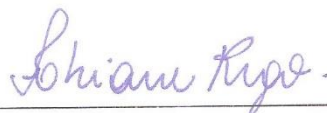
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Fabiane Gomes de Moraes Rego
Departamento de Análises Clínicas, UFPR

Curitiba, 20 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio incondicional, sem vocês eu não teria chegado até aqui, obrigado pelo amor, pelo voto de confiança, por me dar as forças e me ajudar a seguir sempre. Mãe, pai, irmãos e todos na família Piñero Gavidia que estiveram ao longo dos dois anos atentos e me dando forças para continuar independentemente da distância.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcelo Muller Dos Santos e minha co-orientadora Professora Leda Satie Chubatsu, ambos pela sua orientação acadêmica, profissional e de vida. Assim como também pelos momentos de parceria ao longo desses dois anos de formação. Também a todo o programa de pós-graduação em bioquímica, professores, técnicos e alunos que dia a dia fazem as suas pesquisas para o desenvolvimento da ciência no Brasil.

Aos meus companheiros da sala 271-272 e todo o pessoal do núcleo de fixação de nitrogênio em especial a Paloma, Rafaela, Maritza, Luis Paulo, Edson, Cicero, Edileusa, Marcelo Batista, Marcelo, Fernanda, Helô, agradeço por todos os seus ensinamentos e a ajuda para desenvolver os meus experimentos. Também a Roseli Prado e Lucineia, vocês constituem uma parte fundamental da equipe do núcleo de fixação.

Ao pessoal da sala do sequenciamento: O Valter, Eduardo, Vania e a Michele por toda a ajuda prestada ao momento das análises e pelo sequenciamento.

Ao “comité de despedida do Manuel” no aeroporto: Mildred, tia Neida, Yarisma, Coromoto. Eu não sei o que seria de mim sem vocês, pelos conselhos, o apoio, a força que vocês me deram. Por sempre grato.

Aos meus amigos lá na Venezuela: minha Petit, o Alfredo, Joany, Guillermo e todos os meus amigos do departamento de Biologia e professores da UC. Aos que estão agora em Brasil: Aura, Elvis, Patricia, Oranys, Alfredo, Meira. Por sempre agradecendo a sua companhia e os bons momentos cheios de nossa cultura aqui no Brasil

A Rocio (mãe), Ana Salinas, Sandra, Martha (Mexico), esses anjos que chegam para nos ajudar e fazer a nossa vida mais plena, agradecido sempre por tudo o que vocês fizeram por mim. De coração espero que o universo devolva em felicidade plena.

A minha mana Normanda que abriu as portas do seu coração e do seu lar, quem ao longo desses dois anos compartilhou muitas coisas comigo e pela qual também teve a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas: Mayara, Jaqueceli, Jaqueline, Lolo e todo o pessoal do teatro, brigado por encher de luz e alegria minha vida.

Paulinha jamais esquecerei de você, saiba sempre o quão especial você é para mim, brigado pelos conselhos, as saídas, os filmes juntos, a parceria, o respeito e a aceitação. Isso também para o resto do pessoal na Ana Berta Roskamp, 600 (Valber, Fernando, Luiz) obrigado sempre.

Aos meus parceiros latinos aqui no Brasil e em outras partes do mundo: Lisandro, Rolf, Melissa, Omar, Gerald, Martin e todos os intercambistas que conheci, por me mostrar um pouco de sua cultura e as coisas que compartilhamos.

Um agradecimento especial a Daniel, Paola, Sergio e Miguel pelos bons momentos e por sempre sacar um sorriso com as suas mensagens, por me mostrar que amizade não tem fronteiras.

Aos meus manos da republica Araucaria, foram vocês que me ensinaram que a família é Ter respeito, amor e consideração pelos os outros mais do que os laços de sangue.

Ao Rodrigo e também ao João, brigado por me acompanhar nesta viagem. De vocês levou muitos ensinamentos e os bons momentos compartilhados, o seu apoio foi fundamental para chegar até aqui, e agradeço vocês por fazer os meus dias mais felizes.

Finalmente quero agradecer às agencias financiadoras CAPES e a Organização dos Estados Americanos por ter me dado a oportunidade da bolsa aqui no Brasil

A Oficina Internacional para as Migrações (OIM) em Venezuela, sem vocês não teria sido possível a minha vinda ao Brasil.

Os estranhos são aquela família que você ainda não conhece
Mitch Albom

La vida no es fácil para ninguno de nosotros, pero... que importa?
We must have perseverance and above all confidence in ourselves.
Temos que nós sentir dotados para realizar alguma coisa
E que essa coisa deve ser alcançada

Marie Curie

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Plásticos.....	5
3.2 Degradação de plásticos	6
3.3 Biopolímeros e bioplásticos	7
3.3.1 Polissacarídeos	8
3.3.2 Poliésteres.....	9
3.3.3 Polihidroxicarboxilatos	10
3.4 Síntese e degradação de PHAs: genes e proteínas implicadas	14
3.4.1 PHA sintases	16
3.4.2 Fasinases	16
3.4.3 PHA depolimerases	18
3.4.4 Regulador Transcricional PhaR.....	18
3.5 Importância do PHB em bactérias.....	22
3.5.1 Resistência a estresse	22
3.5.2 Alterações na capacidade de agregação	22
3.5.3 Alterações na motilidade/resposta quimiotática	23
3.6 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Materiais.....	25
4.1.1 Bactérias e estirpes	25
4.1.2 Plasmídeos:.....	25
4.1.3 Primers	26
4.2 Meios de cultura	26
4.3 Soluções	28
4.3.1 TBAC:EtOH.....	28
4.3.2 Solução de metanólise	28
4.3.3 GET	29

4.3.4	Kcaf	29
4.3.5	Solução de Lise	29
4.3.6	Tampão de Extração TRIzol.....	29
4.4	Antibióticos	30
4.5	Crescimento e produção de PHB nas estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	30
4.5.1	Curva de crescimento:	30
4.5.2	Quantificação de PHB por Citometria de Fluxo.....	31
4.5.3	Quantificação de PHB por cromatografia gasosa (GC)	32
4.6	Determinação da expressão do gene <i>phaR</i> por RT-PCR semi-quantitativa	33
4.6.1	Extração de RNA	33
4.6.2	Precipitação do RNA com glicogênio	34
4.6.3	Tratamento com DNase e preparação de cDNA	35
4.6.4	Reação de PCR e avaliação dos níveis de expressão de <i>phaR</i>	36
4.7	Complementação do mutante $\Delta phaR$	37
4.7.1	PCR para amplificação do gene <i>phaR</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1	37
4.7.2	Digestão do fragmento <i>phaR</i>	38
4.7.3	Precipitação e recuperação do DNA	38
4.7.4	Transformação e purificação de DNA Plasmidial.....	38
4.7.5	Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	41
4.7.6	Ligação de DNA.....	41
4.7.7	Conjugação biparental entre <i>E. coli</i> e <i>H. seropedicae</i>	44
4.8	Sequenciamento de DNA da região <i>phaR</i> no plasmídeo pMJP01	45
4.9	Análise transcriptômica do mutante $\Delta phaR$	46
4.9.1	Depleção de rRNA	46
4.9.2	Construção e sequenciamento da biblioteca.....	46
4.9.3	Análise Bioinformática	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Avaliação do crescimento e síntese de PHB das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	47
5.2	Determinação dos níveis de expressão do gene <i>phaR</i>	51
5.3	Análise do transcriptoma diferencial entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaR$	56
5.3.1	Reguladores transcricionais:.....	61
5.3.2	Síntese e armazenamento de PHB	61
5.3.3	Síntese e degradação de açúcares	63
5.3.4	Biossíntese de ácidos graxos	64
5.3.5	Fosforilação oxidativa	67
5.3.6	Transportadores e genes relacionados ao estresse.....	69

5.3.7	Nitrato Redutase Respiratória (NAR)	70
5.3.8	Transportadores ABC.....	71
5.3.9	Proteínas de proteção contra o choque oxidativo e térmico	71
5.3.10	Quorum sensing	72
5.4	Reavaliação do crescimento celular e produção de PHB em estirpes complementadas com o plasmídeo pMJP01	72
6.	CONCLUSÕES.....	78
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de Poliésteres bacterianos.....	9
Figura 2. Biopolímeros disponíveis na natureza e com aplicação industrial.	10
Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos.....	11
Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção de <i>H. seropedicae</i> SmR1	11
Figura 5. Organização dos genes implicados na síntese de PHAs em <i>Ralstonia eutropha</i> e <i>Pseudomonas oleovorans</i>	14
Figura 6. Via de síntese de PHB em bactérias	15
Figura 7. Modelo da regulação da expressão de PhaP1 mediado pelo repressor PhaR em <i>Ralstonia eutropha</i>	19
Figura 8. Resumo da clonagem do fragmento phaR no plasmídeo pBBR1MCS-3 REP	43
Figura 9. Curva de crescimento das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> crescidas em diferentes fontes de carbono.....	47
Figura 10. Produção de PHB nas estirpes <i>H. seropedicae</i> SmR1 e mutante $\Delta phaR$ crescidas em meio NFb-malato HPN.....	50
Figura 11. Qualidade do RNA das amostras obtidas após extração com TRIzol	53
Figura 12. Eletroforese do gene <i>rrsA</i> (16S) e o fragmento <i>phaR</i> amplificado por PCR a partir do cDNA de <i>H. seropedicae</i> SmR1.	54
Figura 13. Mecanismo de reação da malonato descarboxilase em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65
Figura 14. Fosforilação oxidativa e genes reprimidos em <i>H. seropedicae</i> $\Delta phaR$	67
Figura 15. Curva de crescimento em meio NFb-HPN com galactose das estirpes SmR1, $\Delta phaR$ e $\Delta phaR$ complementado com pMJP01.	73
Figura 16. Avaliação da produção de PHB por citometria de fluxo	75
Figura 17. Avaliação da produção de PHB por cromatografia gasosa.....	75
Figura 18. Análise de correlação das técnicas citometria de fluxo e cromatografia gasosa avaliando a produção de PHB nas estirpes SmR1, mutante $\Delta phaR$ e $\Delta phaR$ complementado de <i>H. seropedicae</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias produtoras de PHAs e composição dos polímeros baseado na fonte de carbono fornecida.....	12
Tabela 2. Tempo de geração das estirpes cultivadas em diferentes fontes de carbono.	48
Tabela 3. Qualidade das amostras de RNA empregadas para a síntese de cDNA.....	52
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na estirpe mutante Δ phaR	57
Tabela 5. Análise das bibliotecas de RNA seq.....	60
Tabela 6. Tempo de geração das estirpes crescidas em meio NFb-HPN com galactose.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Proteína carregadora de grupos acilo
cDNA: DNA complementar
C/N: Proporção carbono-nitrogênio
D.O.₆₀₀: Densidade ótica no comprimento de onda 600 nm
DEPC: Dicarbonato de dietila
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH: Etanol
FC: Fold change
H₂O: Água
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
H_{AMCL}: Hidroxialcanoatos de cadeia meia
IPTG: Isopropiltiogalactosídeo
KCl: Cloreto de Potásio
KH₂PO₄: Fosfato de potássio dibásico
LA: Agar Luria Bertani
LB: Luria Bertani
LPS: Lipopolissacarídeos
MgCl: Cloreto de magnésio
MQ: MilliQ
Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico
NaCl: Cloreto de sódio
NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH: hidróxido de sódio
PAPs: Proteínas associadas ao grânulo de PHAs
PCL: Policaprolactona
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PGA: Ácido poliglicólico ou poliglicolato
PHA: Polihidroxialcanoatos
P_{HAMCL}: Polihidroxialcanoatos de cadeia meia
P_{HASCL}: Polihidroxialcanoatos de cadeia curta
PHB: Polihidroxibutiratos
PHBV / P(3HB-co-3HV): Poli(hidroxibutirato-co-valerato)
PLA: Polilactato
PTE: Poliéster
RNA: Ácido ribonucleico
RNase: Ribonuclease
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TBE: Tris/Borato/EDTA
UDP: Uridina difosfato
Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

RESUMO

O acúmulo de rejeitos plásticos no mundo representa na atualidade um dos maiores problemas ambientais. Os “bioplásticos” são compostos com propriedades muito similares aos plásticos que sintetizados por numerosos organismos. Os polihidroxicanoatos são um tipo de bioplásticos produzidos por diversos grupos de bactérias como estoque de carbono e energia, possuem propriedades termoplásticas, elastoméricas e são resistentes a ruptura. *Herbaspirillum seropedicae* é uma betaproteobactéria fixadora de nitrogênio também capaz de produzir polihidroxibutirato (PHB). Foram identificados vários genes implicados na biossíntese e formação do grânulo de PHB dentro de bactéria, além dos genes das fasinas *phaP*, *phaP2*, encontrou-se o gene *phaR* que codifica para uma proteína reguladora PhaR, a qual se liga ao DNA na região de vários genes implicados na biossíntese de PHB. Em estudos prévios feitos pelo grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná foi gerado o mutante $\Delta phaR$ derivado da estirpe parental SmR1 que apresentou uma dinâmica de produção de PHB diferente na estirpe selvagem SmR1, neste projeto foi estudado o perfil transcriptômico do mutante $\Delta phaR$ de *H. seropedicae* comparando os níveis de expressão dos genes com a estirpe selvagem propondo uma possível via de regulação da proteína repressora *PhaR*, também foi avaliado o crescimento do mutante em diferentes fontes de carbono e a produção de PHB. O mutante $\Delta phaR$ apresentou uma diminuição na produção de PHB e diferenças no perfil de crescimento em meio com galactose respeito à estirpe parental SmR1. Na avaliação transcriptômica foram encontrados sobre expressos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos assim enquanto transportadores de aminoácidos ramificados e acetaldeído desidrogenase tiveram a sua expressão diminuída; revelando um possível redirecionamento do Acetil-coA que não está sendo empregado na síntese de PHB. Além disso, foi encontrado sobre expresso um gene que codifica para uma proteína envolvida no estresse oxidativo enquanto genes que codificam para o complexo IV da cadeia respiratória tiveram a sua expressão diminuída, indicando uma possível resposta ao estresse gerado pelo acúmulo de fatores redutores como NADH. Genes envolvidos no metabolismo de galactose tiveram a sua expressão aumentada, enquanto vários reguladores transcricionais, entre eles um envolvido no metabolismo de arabinose *araC*, tiveram expressão diminuída. Foi demonstrado também o papel de PhaR como regulador de fasinas já que ambos genes tiveram a sua expressão aumentada.

Palavras chave: Polihidroxibutirato, Transcriptoma, *Herbaspirillum seropedicae*, repressor, expressão genética.

ABSTRACT

Worldwide plastic waste accumulation is one of the main issues to address today, current alternatives are based on the development of new materials that can be easily degraded biologically in short periods without any contamination. “Bioplastics” are compounds whose properties are very similar to oil derived plastics but they are synthesized by living organisms. Polyhydroxyalkanoates are compounds related to bioplastics produced by several bacteria as an energy and carbon storage. They have good thermoplastics and elastomeric properties and are resistant to break. *Herbaspirillum seropedicae* it's a nitrogen fixating betaproteobacteria, also able to produce Polyhydroxybutyrate (PHB). There were identified several genes involved in PHB synthesis and granule formation, besides the phasins genes *phaP1*, *phaP2*, there was found the *phaR* gene that codifies a regulatory protein PhaR, which is able to bind DNA in several regions of genes involved in PHB synthesis. In previous studies developed by the Nitrogen Fixation Group of the Universidade Federal do Paraná the $\Delta phaR$ mutant was constructed from the parental strain SmR1, this mutant showed differences in the PHB production when compared to the wild type SmR1, in this work the transcriptomic profile of the $\Delta phaR$ mutant was studied and the levels of expression compared with the wild type SmR1, a possible regulation pathway of the PhaR protein was proposed, also the growth dynamics in different carbon sources and PHB production was assayed. The $\Delta phaR$ mutant showed a decreased in PHB production, and differences in growth patterns when grown in galactose. The transcriptomic profile showed an over expression of genes involved in fatty acid biosynthesis whereas there was a decrease on the expression of branched chain aminoacids and acetaldehyde dehydrogenase genes, this shows a possible path for redirecting Acetyl-coA surplus because of low PHB production. Besides, there were found over expressed genes involved in oxidative stress whereas transcription of genes responsible for the synthesis of complex IV of the respiratory chain were decreased, indicating a possible response to stress generated for excess of NADH. Genes involved in galactose metabolism had an augmented expression in the $\Delta phaR$ mutant whereas genes involved in transcription regulation included *araC*, a regulator of the arabinose metabolism presented a decrease on its transcription. It was demonstrated also the role of PhaR as a phasin regulator since both phasins presented an augmented transcription.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Transcriptome, *Herbaspirillum seropedicae*, repressor, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população humana provocou o acúmulo de uma grande quantidade de rejeitos plásticos não biodegradáveis em todo o planeta.

Atualmente o mundo todo consome em torno de 140 milhões de toneladas de plásticos por ano. Processar essa quantidade de materiais precisa em torno de 150 milhões de toneladas de combustíveis fósseis, além dos materiais empregados no processo de produção que são difíceis de substituir (plásticos, gomas, coberturas e adesivos) (SHIMAO, 2001; SINGH; SHARMA, 2008).

Os plásticos convencionais precisam uma grande quantidade de tempo (décadas ou mais) para serem decompostos naturalmente, tendendo a gerar durante o processo compostos nocivos para a saúde animal e humana. Sendo assim, existe um interesse crescente na produção de plásticos que possam ser eliminados de forma “ecologicamente correta” denominados bioplásticos (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

O interesse no estudo de bioplásticos cresceu recentemente devido a diminuição das reservas petrolíferas, sendo que a maior parte dos materiais plásticos disponíveis atualmente derivam da cadeia produtiva do petróleo. Sabendo que o petróleo é uma fonte finita, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção de materiais plásticos que utilizem recursos renováveis.

Os bioplásticos são polímeros naturais sintetizados e degradados por inúmeros microrganismos, tem a vantagem de não produzir efeitos tóxicos na biosfera ao contrário dos plásticos derivados do petróleo. Estes biopolímeros são acumulados no interior de microrganismos como material de reserva sob condições de limitação de algum nutriente essencial ou quando há um excesso da fonte de carbono no meio de cultivo (SHAH et al., 2008).

Os principais bioplásticos produzidos por bactérias são os polihidroxialcanoatos (PHA), como principal exemplo o homo poliéster de ácido 3-hidroxibutírico chamado polihidroxibutirato (PHB). O PHB foi descrito pela primeira vez em 1926 por Maurice Lemoigne, sendo que a sua função não foi estudada pelos próximos 30 anos quando no ano de 1958 Macrae e Wikilson reportaram a biodegradabilidade desse tipo de compostos, sintetizados por *Bacillus megaterium* e por outras bactérias como *Bacillus cereus* (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

A produção deste tipo de material tem sido incentivada em países da América do Norte e Europa, como uma alternativa viável para a produção de bioplásticos, por exemplo a produção industrial da mistura poli-3-hidroxibutirato e poli-3-hidroxivalerato produzido por *P. oleovorans*. Embora o custo dos PHAs ainda seja menos vantajoso em comparação ao processo químico dos plásticos derivados do petróleo, seria possível baixar o custo da produção de derivados de PHAs utilizando insumos de baixo custo e modificação genética de microrganismos produtores, tornando-os mais eficientes (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

A síntese de PHB envolve três enzimas e os genes que as codificam são: *phaA* codifica para a enzima β -cetotiolase, a primeira enzima da via encarregada da condensação de duas moléculas de acetil-CoA originando acetoacetil-CoA, *phaB* codifica a enzima acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH, que reduz o acetoacetil-CoA a (R)-3 hidroxibutiril-CoA e *phaC* que codifica a PHA sintase, a enzima que polimeriza monômeros de (R)-3-hidroxibutiril-CoA formando PHB (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005b).

Algumas bactérias armazenam PHA como uma forma de estocar carbono e também energia já que a síntese de PHA consome equivalentes reduzidos que são regenerados durante a degradação dos mesmos. A síntese de PHB também pode ser estimulada pela limitação de outros nutrientes, tais como nitrogênio, fosfatos, ferro, enxofre, potássio, magnésio e oxigênio. Quando o fornecimento é restabelecido a bactéria pode metabolizar o estoque de PHA e produzir energia (JENDROSSEK; SCHIRMER; SCHLEGEL, 1996).

O polímero de PHB é armazenado no interior da célula como inclusões insolúveis denominadas grânulos, os quais contem cerca de 2% de proteínas. Entre as proteínas associadas nos grânulos a fasina (codificada pelo gene *phaP*) é a mais abundante. Acredita-se que as fasinas evitam a coalescência dos grânulos de PHB revestindo a sua superfície; porém existem outras proteínas no grânulo incluindo reguladores transcricionais como PhbF em *Pseudomonas oleovorans*, PhaR de *Paracoccus denitrificans* e *Ralstonia eutropha*, PHA sintases, PHA depolimerases entre outras (CHOU; YANG, 2010; MAEHARA et al., 2001, 2002; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998)

A β -Proteobactéria *Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico que se encontra associado com espécies de gramíneas de importância econômica como cana de açúcar, sorgo, milho e arroz (BALDANI et al., 2016; CHAVES et al., 2007). *H. seropedicae* SmR1 é descrita como um produtor de PHB empregando diferentes fontes

de carbono. A análise da sequência do genoma de *H. seropedicae* SmR1 mostrou uma série de genes envolvidos no metabolismo do PHB, entre eles *phaA*, *phaB*, *phaC* que codificam para as enzimas 3-cetotiolase, acetoacetyl-CoA reductase e PHB sintase respectivamente. Além do gene *phaP* que codifica a proteína fasina foi encontrado também um gene que codifica o regulador denominado *phaR* a jusante da região *phaBC* (KADOWAKI, 2012).

O gene *phaR* (locus_tag Hsero_2997, novo ID HSERO_RS15030) foi anotado inicialmente no projeto genoma de *H. seropedicae* SmR1 como *phbF*, entretanto, pelo fato deste gene codificar uma proteína de 188 aminoácidos com uma alta similaridade com a já caracterizada proteína PhaR de *R. eutropha* H16 (183 aminoácidos, 83% de identidade, 90% de similaridade), decidiu-se reanotá-lo como *phaR*.

A PhaR de *H. seropedicae* SmR1 apresenta similaridade em menor grau com as proteínas PhaR de *Rhodobacter spheroides* FJ1 (41% identidade, 59% similaridade) e *Paracoccus denitrificans* (restrito ao extremo N-terminal com 37% de identidade e 56% de similaridade nos primeiros 120 aminoácidos).

A análise computacional comparativa da provável estrutura da proteína PhaR revelou a presença de uma região hélice-volta-hélice na porção N-terminal, indicando ser uma proteína capaz de ligar ao DNA atuando como um auto-regulador da sua síntese e dos genes implicados na biossíntese de PHB em *H. seropedicae* SmR1. A PhaR de *H. seropedicae* SmR1 foi capaz de interagir com 11 regiões promotoras de genes potencialmente envolvidos com o metabolismo de PHB, sendo identificada uma sequência conservada TG[N]TGC[N]3GCAA como alvo de reconhecimento da PhaR (KADOWAKI, 2012).

Até o momento os dados obtidos com a análise funcional do regulador transcricional PhaR apontam que este regula negativamente a sua própria transcrição e a transcrição de *phaPI*, o gene que expressa a principal fasina. Além disso, PhaR é capaz de interagir *in vitro* com regiões regulatórias de outros genes envolvidos no metabolismo de PHB. Portanto, acredita-se que a proteína tenha um papel importante ainda não descrito na transição entre os estados de baixo para alto acúmulo de PHB. Para se investigar o papel de PhaR de forma global, este projeto visa analisar o transcriptoma diferencial entre o mutante $\Delta phaR$ e sua estirpe parental *H. seropedicae* SmR1.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o transcriptoma diferencial entre as estirpes parental *H. seropedicae* SmR1 e o mutante $\Delta phaR$.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1 Avaliar o crescimento e a produção de PHB das estirpes *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaR$ no meio NFB-malato HPN e com outras fontes de carbono.
- 2.2.2 Avaliar os níveis de expressão do gene *phaR* na estirpe SmR1 em meio NFB-malato HPN em diferentes estágios de crescimento.
- 2.2.3 Realizar a análise de transcriptoma das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ para determinar os genes diferencialmente expressados.
- 2.2.4 Complementar geneticamente o mutante $\Delta phaR$ expressando uma cópia nativa do gene *phaR* de *H. seropedicae* SmR1.
- 2.2.5 Gerar um mapa dos genes diferencialmente expressos e as possíveis vias metabólicas afetadas pela atividade do repressor PhaR sobre o crescimento e produção de PHB em *H. seropedicae*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plásticos

Os plásticos são compostos feitos pelo homem a partir de polímeros de cadeia longa derivados do petróleo. Há mais de meio século esses compostos começaram a substituir os materiais naturais em praticamente todas as áreas e, atualmente, os plásticos tem se convertido em compostos indispensáveis para nossa vida. Com o tempo, a estabilidade e durabilidade desses compostos tem melhorado significativamente, e consequentemente este grupo de compostos é agora considerado um sinônimo de materiais resistentes às diferentes influências do meio ambiente. A palavra plástico é derivada do grego “plástikos” que significa “capaz de ser moldado em diferentes formas” (SHAH et al., 2008).

Os plásticos encontrados hoje são feitos a partir de uma mistura de materiais orgânicos e inorgânicos, como carbono, silício, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e cloro. Os materiais básicos empregados na produção são extraídos a partir do petróleo, carvão, e gás natural (LUENGO et al., 2003).

Atualmente, uma ampla variedade de polímeros sintéticos derivados do petróleo são produzidos mundialmente, representando milhões de toneladas por ano e muitos desses compostos são introduzidos nos ecossistemas como rejeitos industriais e pelo uso humano (SHIMAO, 2001).

O incremento dramático na produção e a falta de biodegradabilidade dos polímeros comerciais, principalmente, matérias-primas plásticas empregadas no empacotamento (por exemplo comidas rápidas), no setor industrial e inclusive na agricultura, tem chamado a atenção pública devido ao acúmulo potencial e o problema da poluição que pode continuar durante séculos. Hoje em dia os rejeitos plásticos são dispensados em aterros, incinerados ou reciclados. Devido a sua persistência no meio ambiente, muitas comunidades tornam-se mais sensíveis aos impactos provocados pelos mesmos, os efeitos prejudiciais na vida selvagem, a qualidade estéticas nas cidades e florestas (SHAH et al., 2008).

Uma parte dos plásticos empregados atualmente como poliuretano, poliéster, polietileno misturado com celulose, podem ser degradados em certas condições, embora a maioria dos materiais usados como matéria-prima continua sendo não degradável ou o processo pode demorar até décadas. Isto tem provocado o surgimento de uma preocupação crescente sobre a degradabilidade e, ao mesmo tempo, promovido atividades de pesquisa em todo o mundo para modificar os produtos atuais, tornando-os mais facilmente biodegradáveis ou experimentar com novas matérias que sejam degradáveis por qualquer ou todos os seguintes mecanismos: biodegradação, fotodegradação, erosão provocada pelo ambiente e degradação térmica (SHAH et al., 2008; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

3.2 Degradação de plásticos

A degradação de plásticos envolve mudanças químicas na estrutura desses compostos resultado de fatores ambientais tais como luz, calor, humidade, condições químicas ou atividade biológica. Tal degradação é refletida nas mudanças das propriedades dos materiais como as características mecânicas, óticas, rachaduras, fraturas, erosão, descoloração, separação de fases ou delaminação. Esses câmbios incluem excisão química, transformação e formação de novos grupos funcionais. A degradação pode ser foto, térmica ou biológica (SINGH; SHARMA, 2008).

A fotodegradação refere-se à capacidade de absorver a parte prejudicial da radiação solar, tal como a radiação UV-B terrestre (295-315 nm) e a radiação UV-A (315-400 nm), responsável pela foto degradação direta (fotólise). A parte visível do espectro acelera a degradação polimérica por calor. A radiação infravermelha (760-2500 nm) acelera a oxidação térmica. A maioria dos plásticos tende a absorver radiação de alta energia na porção ultravioleta do espectro, o qual ativa os seus elétrons para o mais alto nível reativo provocando a oxidação, clivagem e outros tipos de degradação (NAGAI et al., 2008).

A degradação térmica dos polímeros é provocada pelo aquecimento a altas temperaturas dos componentes de cadeia longa do polímero, fazendo com que este comece a se separar (excisão molecular) e reagir entre si mudando as propriedades do polímero. As reações químicas envolvidas na degradação térmica conduzem a mudanças nas propriedades físicas e óticas quando comparadas com as condições iniciais. A

degradação térmica envolve mudanças no peso molecular e nas propriedades típicas do polímero, fragilização, branqueamento, mudança nas cores, rompimento e a redução geral da maioria das propriedades físicas desejadas (SHAH et al., 2008).

A oxo-biodegradação é um processo que envolve duas etapas, a primeira é a oxo-degradação que resulta da adição na composição do plástico de compostos oxidantes, esses compostos geralmente contêm metais de transição como cobalto, manganês ou ferro, que podem provocar a fragmentação como resultado da oxidação química. Após a fragmentação segue a biodegradação (SINGH; SHARMA, 2008).

A biodegradação é um processo pelo qual as substâncias orgânicas presentes no meio ambiente são convertidas em compostos mais simples, mineralizadas e redistribuídas por meio dos ciclos de elementos essenciais como ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre. A biodegradação pode acontecer somente dentro da biosfera já que os organismos vivos desempenham um papel importante no processo de degradação (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Os materiais orgânicos podem ser degradados na presença ou ausência de oxigênio (LUCAS et al., 2008).

Os microrganismos como bactérias e fungos podem degradar materiais naturais e sintéticos. A biodegradação dos plásticos é um processo que acontece de forma ativa na natureza sob diferentes condições, dependendo das propriedades dos compostos. Devido às diferenças entre os microrganismos responsáveis pela degradação, há diferentes condições ótimas para seu crescimento e capacidade de degradar os compostos. Os polímeros, especialmente os plásticos são degradados por alguns microrganismos heterotróficos (CHANPRATEEP, 2010; LUCAS et al., 2008; SHIMAO, 2001).

3.3 Biopolímeros e bioplásticos

Os polímeros são macromoléculas compostas pela ligação repetitiva de moléculas menores denominadas monômeros. Os polímeros podem ser lineares, ramificados ou de forma reticulada numa rede tridimensional. Na atualidade existem no mercado, os seguintes polímeros: Teflon, Nylon, policloreto de vinilo, poliésterano, poliestireno, poliuretano, todos eles derivados do petróleo. Porém, existem também polímeros de origem natural tais como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e borracha natural (HASIRCI et al., 2001).

Os biopolímeros constituem um tipo especial de material sintetizado por muitos organismos vivos na natureza, eles constituem a maior fração do peso seco celular. De acordo com a estrutura química, os biopolímeros pertencem a 8 classes: (1) ácidos nucleicos como o DNA e o RNA, (2) poliamidas como proteínas ou poli aminoácidos, (3) polissacarídeos como a celulose, dextrana e amido, (4) poliésteres (PTEs) que tem sido reportado recentemente como são poli(3-mercaptopropionato), (5) polianidridos com polifosfato como único exemplo, (6) poliisoprenóides como borracha natural, (7) polifenóis como a lignina, (8) poliésteres como polihidroxicanoatos (PHAs) e polimalato (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005b).

Os bioplásticos são um tipo especial de biopolímeros. Eles são poliésteres produzidos por uma ampla variedade de microrganismos, cultivados em diferentes condições ambientais e nutricionais (MADISON; HUISMAN, 1999). Estes polímeros, que são normalmente lipídeos na natureza, são acumulados como um material de reserva (na forma de grânulos moveis, líquidos e amorfos) permitindo a sobrevivência microbiana sob condições de estresse. O número e o tamanho dos grânulos, a composição dos monômeros, a estrutura macromolecular e as propriedades físico-químicas variam em função do organismo que o produz, eles podem ser observados intracelularmente como grânulos refletos de luz e em estirpes mutantes podem até ocasionar alterações na forma das bactérias (LUENGO et al., 2003).

Uma das principais distinções entre os dois grupos (plásticos sintéticos e bioplásticos) é a fácil degradabilidade que possuem os bioplásticos. A poluição resultante daqueles polímeros que tem um ritmo lento de desaparecimento no meio ambiente é devida principalmente aos polímeros sintéticos; este tipo de polímeros deriva da síntese química e boa parte dos microrganismos da natureza ainda não possui as enzimas necessárias para degradá-los. Em quanto que os polímeros biológicos devido a sua síntese enzimática são degradáveis mais facilmente em meio biológico (JAYASEKARA et al., 2005; SHAH et al., 2008; SHIMAO, 2001).

3.3.1 Polissacarídeos

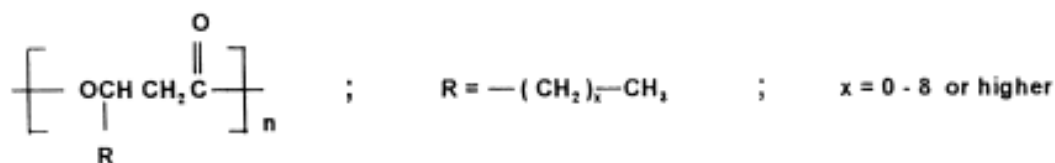
Os mais abundantes na natureza são amido, celulose e quitina. Hoje em dia tem se dado muita importância a outros compostos mais complexos sintetizados por várias

bactérias e fungos, compostos derivados de xantana, pululana e ácido hialurônico os quais contém mais de um tipo de monossacarídeo, diferente do amido e da celulose que contém somente D-glucose, ou quitina, composta de N-acetil-glucosamina.

3.3.2 Poliésteres

Os poliésteres naturais são produzidos por uma ampla variedade de microrganismos como material de reserva. Consistem de uma série de compostos termoplásticos que tem recebido muita atenção pela sua alta biodegradabilidade, pelas suas propriedades similares aos plásticos e pela capacidade de serem sintetizados empregando fontes renováveis. Eles podem ser sintetizados pela policondensação de monômeros difuncionais tais como a condensação de hidroxí-ácidos, diácidos com dióis, cloretos de diácidos com dióis, o pela reação de intercambio de ésteres entre diésteres e dióis, A seguir é apresentada a estrutura geral de poliésteres e alguns exemplos de compostos mais importantes como bioplásticos (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; LUENGO et al., 2003; VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002).

Figura 1. Estrutura geral de Poliésteres bacterianos

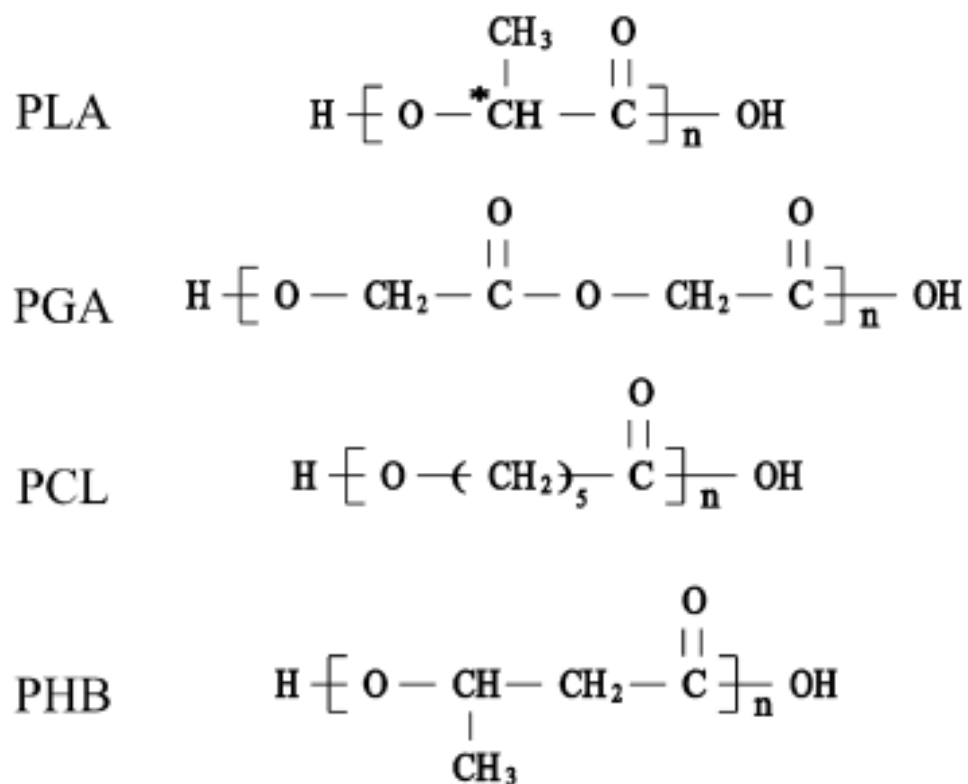


Fonte: (CHANDRA; RUSTGI, 1998)

Descrição: Da esquerda à direita: Ligação do tipo éster que se repete na estrutura do polímero, tamanho do grupo lateral do monômero geralmente linear contendo de 1 a 8 átomos de carbono.

Como a composição monomérica dos poliésteres é extremamente variável e, com isso também as propriedades físicas e termoelásticas, a seguir são apresentados alguns exemplos de poliésteres facilmente degradáveis que são aplicados como bioplásticos atualmente.

Figura 2. Biopolímeros disponíveis na natureza e com aplicação industrial.



Fonte: (VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002)

Descrição: Fórmula estrutural de alguns biopolímeros disponíveis na natureza e que tem aplicação industrial. PLA (polilactato); PGA (ácido poliglicólico ou poliglicolato), PCL (policaprolactona), PHB (polihidroxibutirato).

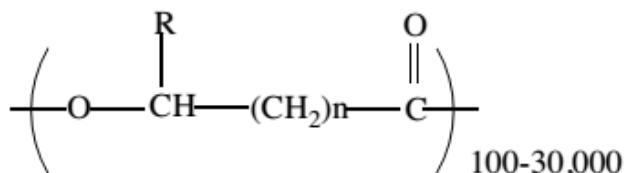
Na atualidade, a principal limitação para a produção em larga escala dos bioplásticos são os altos custos da produção e da recuperação. Contudo, a engenharia genética e metabólica tem permitido sua biossíntese em vários organismos recombinantes (bactérias, leveduras ou plantas transgênicas) melhorando a sua produtividade e diminuindo os custos em geral (LUENGO et al., 2003).

3.3.3 Polihidroxialcanoatos

São compostos derivados da polimerização de ácidos R-hidroxialcanóicos, altamente biodegradáveis, de baixo potencial poluidor e, portanto, ecologicamente corretos ao meio ambiente. A sua composição monomérica varia podendo ser

homopolímeros (com repetições do mesmo monômero) ou mistura de diferentes monômeros (heteropolímeros). Sua fórmula geral é mostrada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos.

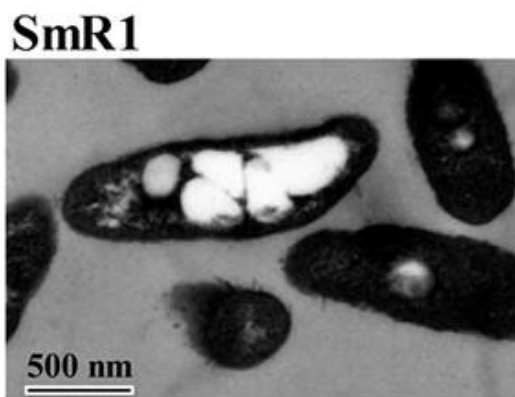


FONTE: (ANJUM et al., 2016).

Descrição: Formula geral dos polihidroxialcanoatos. Os monômeros são ligados entre si por ligações do tipo éster e cada cadeia do polímero pode conter entre 100 e 30.000 unidades monoméricas.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são compostos de armazenamento bacteriano produzidos e depositados intracelularmente na forma de corpos de inclusão (grânulos) podendo representar até 90% de peso seco celular. O ácido poli-3-hidroxi-3-butanóico (PHB) foi o primeiro composto descoberto dos PHA por Lemoigne em 1926 e representa o tipo mais abundante de PHA em bactérias.

Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção de *H. seropedicae* SmR1



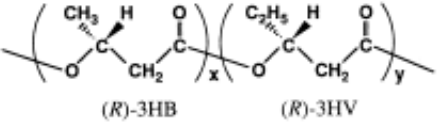
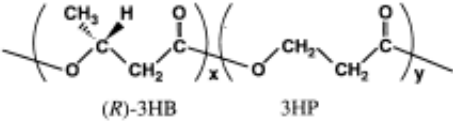
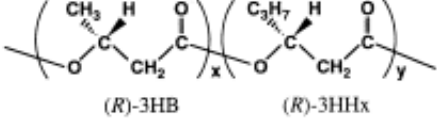
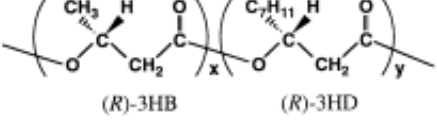
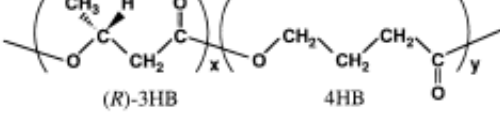
Fonte: (SUDESH; ABE; DOI, 2000)

Descrição: Micrografia de transmissão de uma seção de células da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 contendo no interior grânulos de PHB (em branco, dentro das bactérias).

A composição monomérica dos PHAs depende da espécie da bactéria e da fonte de carbono fornecida durante a fase de acúmulo. Dessa forma foi criada uma classificação para os polihidroxicanoatos que leva em conta o número de átomos de carbono presente nas unidades monoméricas, podendo ser classificados então como PHA de cadeia curta (3-5 átomos de carbono), PHA de cadeia media (6-15 átomos de carbono) e PHA de cadeia longa com mais de 15 átomos de carbono na composição do monômero (ANJUM et al., 2016).

Na Tabela 1, apresenta-se a composição monomérica de vários PHAs sintetizados por diferentes organismos e como a composição monomérica dos mesmos varia quando fornecida uma fonte de carbono diferente.

Tabela 1. Bactérias produtoras de PHAs e composição dos polímeros baseado na fonte de carbono fornecida

Bacterial strain	Carbon substrate	Random copolymer
<i>Ralstonia eutropha</i>	Propionic acid	 (<i>R</i>)-3HB (<i>R</i>)-3HV
<i>Ralstonia eutropha</i>	Pentanoic acid 3-Hydroxypropionoc acid	 (<i>R</i>)-3HB 3HP
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Aeromonas caviae</i>	1,5-Pentanediol Plant oils	 (<i>R</i>)-3HB (<i>R</i>)-3HHx
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Ralstonia eutropha</i>	Sugar 4-Hydroxybutyric acid	 (<i>R</i>)-3HB (<i>R</i>)-3HD
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Comamonas acidovorans</i>	γ -Butyrolactone 1,4-Butanediol 1,6-Hexanediol	 (<i>R</i>)-3HB 4HB

Fonte: (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Descrição: **(R)-3HB**: (R)-3-hidroxibutirato, **(R)-3-HV**: (R)-3-Hidroxivalerato, **3HP**: 3-hidroxipropionato, **(R)-3HD**: (3)-Hidroxidecanoato, **(3)-HHx**: (3)-hidroxihexanoato.

O interesse global em PHAs é devido a sua aplicabilidade em diferentes materiais de empacotamento, dispositivos médicos, produtos de higiene pessoal descartáveis e inclusive na agricultura como substituto de polímeros sintéticos como polipropileno e polietileno (OJUMU; YU; SOLOMON, 2004; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Devido às amplas propriedades termoplásticas e sua biodegradabilidade, os PHAs têm atraído interesse industrial e já tem sido comercializados em pequena escala vários compostos produzidos a partir de bactérias desde o final da década de 80. Apesar de serem produzidos industrialmente há alguns anos, ainda são estudadas novas formas de produção e organismos modificados geneticamente que permitam maior produção em larga escala e com uma eficiência maior.

A maioria dos microrganismos produzem e armazenam PHAs sob condições de limitação de nutrientes, e geralmente possuem as enzimas necessárias para a sua degradação posterior, sendo transformados em monômeros e incorporados novamente em várias vias de degradação para a obtenção de energia (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

Um exemplo, o produto da hidrólise de PHB é o ácido R-3-hidroxibutírico, enquanto a degradação de PHBV gera ambos ácidos R-3-hidroxibutírico e R-3-hidroxivalerato. Os monômeros são solúveis em água e o suficientemente pequenos pra atravessar por difusão passiva a membrana celular, sendo metabolizados pela β -oxidação e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos para produzir dióxido de carbono e água em condições aeróbicas, ou metano em condições anaeróbicas (SCOTT; SCOTT, 1999).

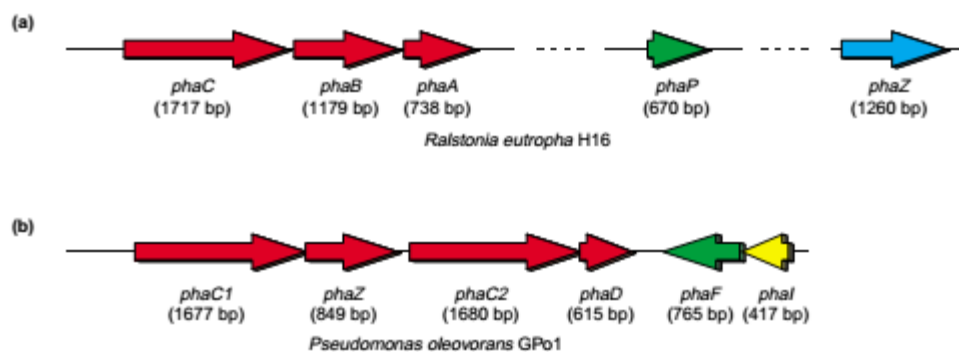
Em geral não são produzidos intermediários tóxicos durante a degradação de PHAs. De fato, o 3-hidroxibutirato é encontrado também nos animais superiores fazendo parte do plasma sanguíneo. Por este motivo, os PHAs tem sido considerados para aplicações técnicas incluindo a liberação de drogas a longo prazo, pinos cirúrgicos, suturas e a substituição de ossos e vasos sanguíneos (LEE, 2000).

Um grande número de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos que degradam PHAs, particularmente bactérias e fungos, tem sido isolado de numerosos ambientes. *Acidovorax faecilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas sp.*, *Pseudomonas lemoignei* e *Variovorax paradoxus* estão entre aqueles presentes no solo, enquanto nos lodos ativados *Alcaligenes faecalis* e várias *Pseudomonas* tem sido isoladas. *Comamonas testosteroni* é um tipo de bactéria produtora de PHAs encontrada no mar, *Idayobacter delafieldii* está presente nos lodos anaeróbicos. A degradação de PHA por *Pseudomonas stutzeri* em águas de lagoas também foi observada (TAKAKU et al., 2006).

3.4 Síntese e degradação de PHAs: genes e proteínas implicadas

Não existe um padrão de sintenia nos genes implicados na síntese de PHAs entre os diferentes organismos produtores que já foram identificados e estudados. Somente em alguns casos, os genes encontram-se associados em pequenos operons. Por exemplo, a organização dos genes do metabolismo de polihidroxibutirato (PHB) em *Ralstonia eutropha* é diferente quando comparada com *Pseudomonas oleovorans*, como mostra a Figura 5.

Figura 5. Organização dos genes implicados na síntese de PHAs em *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*.



Fonte: (LUENGO et al., 2003)

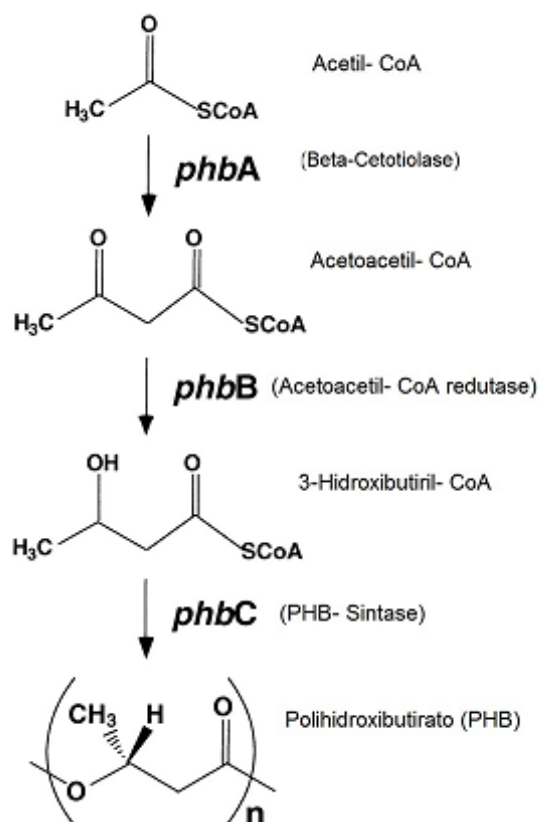
Descrição: Organização dos genes envolvidos na biossíntese de polihidroxialcanoatos em (a) *Ralstonia eutropha* (anteriormente chamada *Alcaligenes eutrophus*), (b) *Pseudomonas oleovorans*.

Em *R. eutropha*, os genes constituem um operon formado por três genes, *phaCBA*. Esse operon codifica as proteínas PhaA (β -cetotilase), que catalisa a síntese de

acetoacetyl-CoA a partir de acetyl-CoA, a proteína PhaB (NADPH-reductase) a qual reduz de forma estereoespecífica acetoacetyl-CoA a R-3-hidroxiacetyl-CoA e a proteína PhaC (PHB sintase) que promove a ligação de monômeros R-(3)-hidroxibutiril-CoA os quais fazem parte do polímero em crescimento. A via de síntese requer somente três enzimas (Figura 6), porém o mecanismo da formação do grânulo e a regulação da síntese de PHB é ainda mais complexo.

No citoplasma das bactérias, os grânulos de PHA chegam a constituir até 80% do peso seco celular. Eles são cobertos por proteínas como as PHA sintases, PHA depolimerases, fasinas, a proteína reguladora PhaR, entre outras. Essas duas últimas junto com outras proteínas que estão sendo estudadas na atualidade são chamadas de “proteínas associadas aos grânulos de PHA” (PAPs) e desempenham um papel importante na síntese, degradação e na formação do grânulo (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005b). A seguir são definidas as funções de cada uma das enzimas encontradas no grânulo de PHB.

Figura 6. Via de síntese de PHB em bactérias



Fonte: (STEINBÜCHEL et al., 1992)

Descrição: Via de síntese de PHB. A via metabólica para a produção de polihidroxibutirato necessita de três genes essenciais representados acima em negrito. O nome de cada enzima está entre parêntese, bem como o nome do substrato e do produto gerado.

3.4.1 PHA sintases

Existem estudos que apontam que as PHA sintases se associam aos grânulos de durante a fase de biossíntese do polímero. Nas células de *R. eutropha* que não estão na fase de acúmulo de PHB, as PHA sintases encontram-se solúveis no citoplasma (GERNGROSS et al., 1993; HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989; LIEBERGESELL; SCHMIDT; STEINBÜCHEL, 1992).

De acordo com a especificidade ao substrato e homologia de sequência de aminoácidos essas proteínas podem ser classificadas em 4 tipos principais: classe I são PHA sintases que sintetizam PHAs de cadeia curta (PHA_{SCL}), a classe II envolve PHA sintases que preferem tioésteres de hidroxialcanoatos de cadeia media (PHA_{MCL}), classe III exibe especificidade também por PHA_{MCL} com a diferença que a enzima é composta de duas subunidades designadas como PhaE e PhaC, por último a Classe IV que também são enzimas formadas por duas subunidades presentes principalmente em algumas espécies de *Bacillus*. No caso a subunidade PhaC da proteína de classe IV precisa de um ativador chamado de PhaR para poder ser ativa (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005b). Esse regulador PhaR não apresenta homologia com o regulador transcricional PhaR objeto de estudo dessa dissertação.

3.4.2 Fasinas

As fasinas são proteínas que desempenham um papel essencial na síntese e formação do grânulo de PHA (GARCÍA et al., 1999; KELLERHALS et al., 2000). São proteínas de baixo peso molecular com uma homologia baixa entre elas e são expressas em altos níveis em células que produzem PHAs (MAEHARA et al., 2002; MCCOOL; CANNON, 1999).

As fasinas não tem função catalítica e apresentam duas regiões ou domínios bem definidos, o primeiro é hidrofóbico e representa a parte que se associa com os grânulos

de PHA em formação. O segundo domínio é mais hidrofílico/anfifílico que fica exposto ao citoplasma das células (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005a).

A camada de fasinas dá estabilidade ao grânulo de PHA e previne a coalescência dos grânulos separados. As fasinas tem ganhado muito interesse nos últimos anos como resultado dos estudos que mostram que a sua inibição pode influenciar negativamente a sínteses de PHA (MAEHARA et al., 2002).

Estudos feitos com um mutante das 4 fasinas em *Ralstonia eutropha* e outras estirpes que expressam níveis baixos das fasinas mostraram uma diminuição de 50% na produção de PHAs em comparação a estirpe selvagem, sugerindo que as fasinas devem se acumular numa grande quantidade para promover a síntese de PHAs (STEINBÜCHEL; WIECZOREK; KRÜGER, 1996).

Além de serem responsáveis pela formação e integridade dos grânulos de PHAs tem sido mostrado que a sua síntese é regulada também por proteínas repressoras. Estudos com a proteína PhaF de *Pseudomonas oleovorans* e PhaR de *Paracoccus denitrificans* proveram informações importantes sobre como a expressão das proteínas envolvidas na síntese de PHA, incluindo as fasinas, podem ser negativamente reguladas na ausência de PHA. Especificamente, PhaF tem sido proposta como um regulador negativo que pode estar ligado ao DNA e PhaR funciona de forma similar, esse último ponto de como PhaR controla a transcrição dos genes implicados na síntese de PHAs precisa ser estudado mais profundamente (STUBBE; YORK; SINSKEY, 2001).

Alguns estudos levaram também à conclusão de que a síntese das fasinas é regulada pela capacidade da bactéria de produzir PHB e que algumas bactérias possuem um mecanismo que pode detectar a síntese e presença de PHB. A expressão das fasinas também foi sugerida como um sensor para a produção de PHB em células individuais, isso devido à observação de que PhaP não é detectável em estirpes que encontram-se geneticamente bloqueadas na síntese de PHB inclusive quando cultivadas em condições que promovem a síntese (STUBBE; YORK; SINSKEY, 2001).

3.4.3 PHA depolimerases

Pelo menos dois tipos destas enzimas estão ativamente envolvidos na degradação biológica do polímero: PHA depolimerases extracelulares (ePhaZ) e intracelulares (iPhaZ). As PHA depolimerases extracelulares são secretadas por vários microrganismos e desempenham um papel importante no metabolismo de PHB no ambiente. Várias PHA depolimerases tem sido isoladas e purificadas a partir de microrganismos pertencentes aos gêneros *Alcaligenes*, *Comamonas* e *Pseudomonas* (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001).

Isso mostra que as PHA depolimerases extracelulares são ubíquas no meio ambiente. A análise sobre a sua estrutura primaria revelou que são compostas por um domínio de ligação ao substrato, o domínio catalítico e uma região linker que conecta as duas. O domínio de ligação ao substrato desempenha um papel importante na ligação ao PHB sólido. Os domínios catalíticos contem a tríade composta por Ser-His-Asp. A serina faz parte de um motivo composto de cinco aminoácidos (Gly-X-Ser-X-Gly), o qual tem sido encontrado na maioria das hidrolases conhecidas como lipases, esterases e serina proteases (JAEGER et al., 1994).

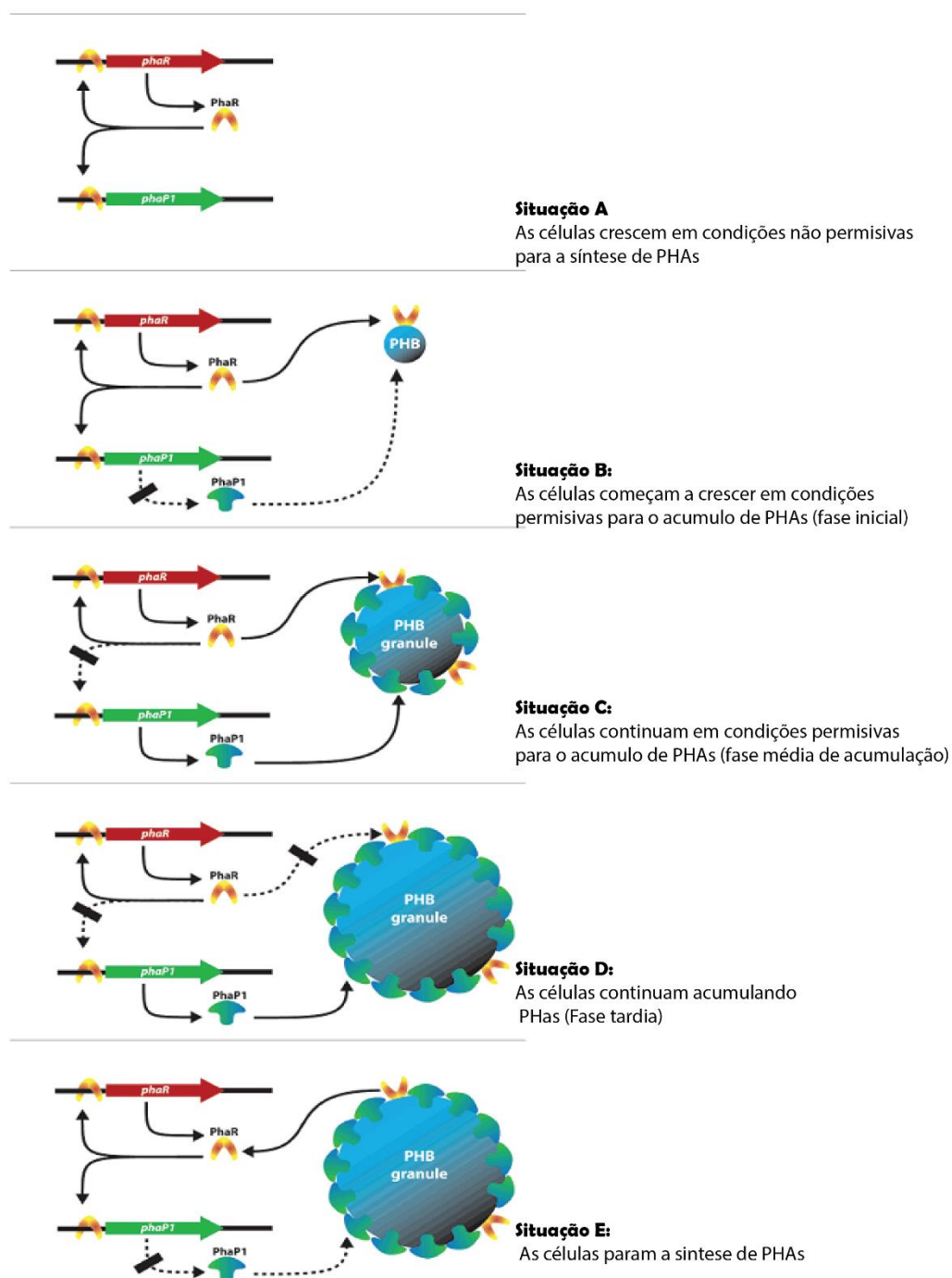
As propriedades das PHA depolimerases tem sido estudadas extensivamente e até hoje se sabe que compartilham várias propriedades bioquímicas, tais como peso molecular relativamente baixo (menor do que 100 kDa), são incapazes de ligar em coluna de troca aniônica tais como DEAE, tem uma afinidade muito forte por matérias hidrofóbicos como butil- e fenil-sefaroze, pH ótimo para a atividade é de 5,5 a 7, são altamente estáveis num amplo intervalo de pH, temperatura e força iônica; a maioria delas é inativada por inibidores de serina-hidrolases (JENDROSSEK, 1998).

3.4.4 Regulador Transcricional PhaR

PhaR tem um papel importante no mecanismo de regulação da síntese de PHAs através da regulação da expressão da fasina PhaP1 em *Ralstonia eutropha*, foi demonstrado que a expressão dessa proteína é reprimida por PhaR em condições de não produção de PHB (MAEHARA et al., 2002). Sabe-se que a PhaR é capaz de se ligar em pelo menos três alvos diferentes: (i) Na região promotora de PhaP1, (ii) na sua própria região promotora e (iii) na superfície dos grânulos de PHB (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005a)

Já foram identificados vários homólogos em bactérias como *Sinorhizobium meliloti*, *Paracoccus denitrificans*, *Allochrodatum vinosum*, e outras bactérias produtoras de PHA_{SCL}. Esses mesmos autores desenvolveram um modelo para explicar como a proteína PhaR modula a síntese de PHB pela regulação da fasina PhaP1, o modelo é apresentado a continuação na figura 7.

Figura 7. Modelo da regulação da expressão de PhaP1 mediado pelo repressor PhaR em *Ralstonia eutropha*



Fonte: (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005a)

Descrição: **Situação A:** se as células estão crescendo em condições que não permitem o acúmulo de PHB, PhaR é incapaz de se ligar aos grânulos porque eles ainda não começaram se acumular, portanto a concentração citoplasmática de PhaR é suficientemente alta para reprimir a transcrição de PhaP1. Não se forma nenhuma proteína PhaP1 e os seus níveis são indetectáveis no citoplasma. **Situação B:** quando as condições o permitem começa a biossíntese de PHB, a proteína PhaC começa a sintetizar as moléculas de PHB que permanecem ligados covalentemente à enzima. No início trata-se de pequenas micelas que vão crescendo lentamente até um ponto no qual PhaC não está cobrindo a totalidade da superfície do grânulo e, portanto, outras proteínas com capacidade de unir à superfície hidrofóbica do grânulo como PhaR se ligam, isso diminui a concentração citoplasmática de PhaR. **Situação C:** a partir de um determinado ponto a concentração citoplasmática de PhaR é tão baixa que não é capaz de continuar reprimindo PhaP1, inicia a transcrição de PhaP1 e começa a se ligar ao grânulo em formação. **Situação D:** Os grânulos de PHB crescem até atingir o seu tamanho máximo, PhaP1 está sendo sintetizada ativamente. **Situação E:** Quando finalmente os grânulos tem atingido o seu tamanho máximo quase a totalidade do grânulo encontra-se coberta por PhaP1 que acaba deslocando a PhaR, conseqüentemente os níveis citoplasmáticos de PhaR incrementam novamente e começa a reprimir novamente a síntese de PhaP1. Esse modelo de regulação assegura que a proteína não seja produzida em níveis superiores aos requeridos para cobrir a superfície dos grânulos ao mesmo tempo que a capacidade de PhaR se ligar a sua própria região promotora prevê a sobre expressão do regulador.

Na estirpe mutante $\Delta phaR$ de *R. eutropha* mostrou-se que PhaP1 é expressa constitutivamente em altos níveis; em outro mutante no qual *phaC* foi deletado não se teve produção de PhaP1, e por isso acredita-se que PhaR continua ligada na região promotora de PhaP1. A deleção de ambas proteínas PhaC e PhaR leva à expressão de PhaP1 mesmo sem a bactéria ter capacidade para produzir PHB (WIECZOREK et al., 1995; YORK; STUBBE; SINSKEY, 2001).

Em *Escherichia coli* expressando os genes *phaABC* mostrou-se que a expressão da fasina ocorria só na ausência da proteína PhaR, sendo fortemente reprimida na presença de PhaR sem PHB (YAMADA et al., 2007). Estudos em *P. denitrificans*

mostraram que PhaR é uma proteína de 22 kDa capaz de se ligar nas regiões a montante dos genes *phaP* e *phaR* (MAEHARA et al., 1999). PhaR é uma proteína repressora responsiva à produção de PHAs baseado nos seguintes fatos: (i) tem sido encontrado vários homólogos de PhaR em muitas das bactérias produtoras de PHAs de cadeia curta, (ii) a produção de PhaP parece ser regulada pela presença de PhaR em resposta à produção de PHB *in vivo*, (iii) PhaR pode se ligar a regiões a montante dos genes *phaP* e *phaR* (MAEHARA et al., 2002).

Outro trabalho feito com a mesma PhaR de *P. denitrificans* sugeriu que possivelmente a proteína tenha pelo menos dois domínios separados, cada um capaz de interagir com o DNA e com a superfície dos grânulos de PHB, sendo que a região C-terminal contém os resíduos essenciais para a ligação ao DNA enquanto a região N-terminal seria necessária para a dobramento correto da proteína (YAMADA et al., 2007).

Em *Rhodobacter sphaeroides* FJ1 os genes envolvidos na síntese, acumulo e degradação de PHB encontram-se no mesmo locus, essa bactéria também possui uma proteína PhaR que atua como um regulador de síntese de PHB. A análise da sequência deduzida de aminoácidos revelou a presença de um motivo volta-helice-volta característico dos domínios de ligação ao DNA, a proteína é capaz de se ligar também nas regiões promotoras de *phaP*, *phaR*, *phaC* e *phaZ*, encontrando-se uma sequência (CTGCGGC(T)GCAG) na região promotora de *phaP* como possível motivo de ligação do repressor. (CHOU; YANG, 2010).

Em *Haloferax mediterranei*, uma haloarchaea produtora de PHAs, a proteína PhaR é capaz de se ligar na região promotora *phaRP* e regular de forma negativa esse operon, os resultados foram muito similares ao que já tinha sido reportado em outros organismos modelos como *R. eutropha*. Porém, na avaliação de mutantes deletados de *phaP* e *phaR* mostrou-se que os duplo mutantes $\Delta phaRP$ apresentaram concentrações de PHA muito mais baixas do que o mutante $\Delta phaP$ dessa forma os autores apontam que proteína PhaR pode ter um papel importante promovendo a síntese de PHAs de forma independente de PhaP, seja estimulando a atividade das PHA sintase ou pelo seu papel como a proteína principal que cobre os grânulos de PHA e impede assim a ligação não específica de outras proteínas citoplasmáticas (CAI et al., 2015).

3.5 Importância do PHB em bactérias

O papel ecológico dos PHA em bactérias sob condições de estresse não tem sido investigado com profundidade. A compreensão desse papel é de uma importância fundamental na ecologia microbiana. O acúmulo, degradação e utilização dos PHAs pelas bactérias em condições de estresse constitui um mecanismo que pode favorecer o estabelecimento, proliferação, sobrevivência e competição com outros organismos, especialmente em ambientes competitivos nos quais as fontes de carbono e energia são limitadas, como ocorre nos solos (OKON; ITZIGSOHN, 1992).

Na atualidade existe muita evidência de que os grânulos de PHB não são simples moléculas de armazenamento mas representam organelas subcelulares bem definidas, compostas pelo polímero central e uma camada superficial na qual várias proteínas com funções específicas encontram-se aderidas (JENDROSSEK, 2009). A presença do PHB ajuda as bactérias sobreviver as limitações no meio ambiente e também na colonização e competição (BALSANELLI et al., 2010; SZNAJDER; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2015).

A seguir são apresentados alguns fenótipos os quais o metabolismo de PHB tem maior influência.

3.5.1 Resistência a estresse

De acordo com as investigações feitas até hoje sabe-se que a exposição das cepas de *Azospirillum brasilense* e o mutante *phbC* a diferentes fatores de estresse demonstrou que a estirpe selvagem é mais resistente que o mutante deficiente de PHB. Quando incubadas num banho de água a 50°C por 70 min, o mutante teve menor sobrevivência que a estirpe selvagem (0,8% versus 36,3%). A estirpe selvagem também mostrou uma maior tolerância a exposição a irradiação UV (254nm) (19,7% selvagem versus 2% mutante). A estirpe mutante também foi mais sensível frente ao estresse osmótico (altas concentrações de glucose de 2 e 4M) ou ao peróxido de hidrogênio 1,5% (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

3.5.2 Alterações na capacidade de agregação

A deleção do gene *phbC* em *A. brasilense* Sp7 também resultou numa alteração fenotípica na agregação da bactéria, sendo que o mutante *phbC* teve três vezes maior

agregação do que a estirpe selvagem após 48h de crescimento em meio com alta proporção carbono/nitrogênio (C/N). O mutante *phbC* produziu quase o dobro de polissacarídeos extracelulares quando comparado com a estirpe selvagem (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

A mutação no gene *phbC* de *Azospirillum brasilense* não provocou diferença na versatilidade metabólica da bactéria quando comparada com a estirpe parental, no entanto os tempos de geração foram significativamente mais curtos na estirpe selvagem quando avaliado o crescimento em meio líquido empregando diferentes fontes de carbono (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

3.5.3 Alterações na motilidade/resposta quimiotática

No caso do mutante *phbC* de *Azospirillum brasilense* foi possível observar que a estirpe mutante apresentou uma motilidade maior quando comparada com a estirpe selvagem, no entanto a maior motilidade não necessariamente está associada a melhor resposta quimiotática. Quando a motilidade em direção a elementos atraentes foi avaliada, a estirpe selvagem mostrou melhor resposta quimiotática em relação ao mutante. Pode-se especular que a ausência de PHB armazenado intracelularmente ou os efeitos pleiotrópicos causados pela mutação no gene *phbC* alteraram a resposta quimiotática em *A. brasilense* (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

3.6 *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Herbaspirillum seropedicae SmR1 é uma beta-proteobactéria, diazotrófica e endofítica de plantas de importância econômica, tais como cana de açúcar, sorgo, milho e arroz. *H. seropedicae* SmR1 tem sido descrita como um produtor de PHB empregando glucose, xilose, galactose, malato e succinato como única fonte de carbono. A análise do genoma de *H. seropedicae* SmR1 revelou uma série de genes provavelmente envolvidos no metabolismo do PHB, entre eles *phaA*, *phaB*, *phaC* que codificam para as enzimas 3-cetotiolase, acetoacetyl-CoA reductase e PHA sintase respectivamente. Além do gene *phaP* que codifica a proteína fasinase foi encontrado também um gene que codifica o regulador denominado *phbF* a jusante da região *phaBC* (KADOWAKI, 2012; PANKIEVICZ et al., 2016; PEDROSA et al., 2011).

O gene *phbF* (renomeado com *phaR*) codifica uma proteína de 188 aminoácidos com uma alta similaridade com a proteína PhaR de *R. eutropha* H16 (183 aminoácidos, 83% de identidade, 90% de similaridade) e no grau menor com as proteínas PhaR de *Rhodobacter spheroides* FJ1 (41% identidade, 59% similaridade) e *P. denitrificans* (restrito ao extremo N-terminal com 37% de identidade e 56% de similaridade nos primeiros 120 aminoácidos).

A análise estrutural da proteína PhaR revelou a presença de uma região hélice-volta-hélice na porção N-terminal indicando que se trata de uma proteína capaz de interagir com o DNA, atuando como um regulador da sua própria expressão e dos genes implicados na biossíntese de PHB em *H. seropedicae* SmR1 (KADOWAKI et al., 2011). Esse mesmo trabalho mostrou a interação da proteína PhaR com a região promotora de vários genes implicados na síntese e degradação de polidroxibutirato.

Sendo que a PhaR de *H. seropedicae* foi descrita como uma proteína reguladora da síntese de PHB, e que maioria dos estudos científicos hoje em dia procuram entender e melhorar as vias biosintéticas implicadas para maximizar a sua produção. Foi feita a deleção do gene *phaR* na estirpe parental SmR1 gerando assim, o mutante $\Delta phaR$ o qual apresentou níveis de PHB menores quando comparado com a estirpe parental. Portanto, visando descobrir as diferenças metabólicas no mutante $\Delta phaR$ que provocam esse efeito realizou-se nesse trabalho a análise transcriptômica do mutante $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Bactérias e estirpes

Bactéria	Característica	Referências
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	Estirpe parental	(PEDROSA et al., 2011)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> $\Delta phaR$	Mutação do gene <i>phaR</i> , deleção total	(ALVES et al., 2016)
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-crBC)$ $\Phi 80lacZ$ $\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>ara</i> $\Delta 139$ $\Delta (ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen Inc.
<i>Escherichia coli</i> S17.1	SmR Tra+	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)

4.1.2 Plasmídeos:

Plasmídeos	Características	Referências
pBBR1MCS-3	Vetor de ampla gama de hospedeiros; 5,3 kb, sítio MCS, LacZ α , TcR.	(KOVACH et al., 1995)
pMJP01	Fragmento de 1151 pb com a região promotora e o gene <i>phaR</i> clonada no vetor pBBR1MCS-3.	Este trabalho

4.1.3 Primers

Nome	Sequência	Sítio para endonuclease de restrição
Fw_phaRc_Hs	5' TGTCTGCAGCGGTTCCGACTTCTCCCTCA 3'	PstI
Rev_phaRc_Hs	5' TGTGAGCTCTGCACTTCCGGAGCCTTTACCTGC 3'	SacI
Fw_rrsA	5'TGGTAGTCCACGCCCTAAAC3'	-
Rev_rrsA	5'TCGAGCACTCCCAAATCTCT3'	-
Fw_phbF_RT*	5'GGTGCTGGACAATGAGGAAT3'	-
Ver_phbF_RT*	5'TTTCCAGGTAGTTGCCCATC3'	-

* Primers desenvolvidos prévio à mudança do nome *phbF* a *phaR*, porém trata-se de um fragmento de *phaR* amplificado a partir do cDNA

4.2 Meios de cultura

Para avaliar o crescimento das estirpes SmR1 e Δ *phaR* de *Herbaspirillum seropedicae* em meio líquido, foi empregado o meio NFb-Malato o qual contém os seguintes elementos na sua composição:

Elemento	Gramas/litro
H₃BO₃	2,8 x 10 ⁻³
MgSO₄.7H₂O	2,0 x 10 ⁻¹
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹
CaCl₂	2,0 x 10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻²
FeSO₄.7H₂O	2,1 x 10 ⁻²
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴
Na₂MoO₄.2H₂O	2,0 x 10 ⁻³
MnSO₄.H₂O	2,35 x 10 ⁻³
CuSO₄.5H₂O	8,0 x 10 ⁻⁵
ZnSO₄.7H₂O	2,4 x 10 ⁻⁴

Adicionalmente por cada litro de solução de meio NFb-Malato ou NFb- com fonte de carbono alternativa (glucose, xilose ou galactose) foram adicionados 50 mL de solução de fosfato (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) assim como 20 mL de solução

de NH_4Cl 1M (concentração final de 20 mM). A adição desses dois componentes constitui um novo meio denominado NFb-malato HPN.

Os meio sólido e semi-sólido foram feitos a partir da mesma composição do meio NFb-malato, com adição de fosfato e amônio e mais 15 g/L de ágar bacteriológico (para meio sólido) ou 1,5 g/L (semi-sólido).

Para avaliar o crescimento das duas estirpes empregando diferentes fontes de carbono, foi empregado o meio NFb- HPN, substituindo o malato por uma das três fontes de carbono abaixo, nas seguintes concentrações:

Monossacarídeo	Concentração (mM)
Glucose	25
Xilose	30
Galactose	25

O crescimento das estirpes de *Escherichia coli* portadoras dos plasmídeos e usadas durante os experimentos de transformação foi feito em meio líquido ou sólido Luria Bertani (LB), adicionando o respectivo antibiótico de resistência.

O meio LB líquido tem a seguinte composição (SAMBROOK; RUSSELL, 2001):

Elemento	Gramas/L
Extrato de levadura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

O meio sólido (LA) tem a mesma composição do meio líquido com a adição de 15 g/L de ágar bacteriológico.

4.3 Soluções

4.3.1 TBAC:EtOH

A solução é empregada para realizar a permeabilização das células e favorecer a assimilação do vermelho Nilo como tratamento prévio à análise de quantificação de PHB por citometria de fluxo. A composição do TBAC é derivada da mistura de tampão PBS (1X) com Tween 20 a 0,01% (m/v), e EDTA pH 8,0 a 1 mM. Essa solução foi filtrada por vácuo utilizando uma membrana de 0,2 μm , armazenada num frasco limpo estéril até o momento do experimento quando finalmente foi empregada pura ou misturada com etanol EtOH 100% da Sigma Aldrich na proporção 1:1.

A composição do tampão PBS é apresentada a seguir (SAMBROOK; RUSSELL, 2001):

Composto	Quantidade por Litro (g)	Concentração (mM)
NaCl	8	137
KCl	0,2	2,7
Na₂HPO₄	1,44	10
KH₂PO₄	0,24	1,8

4.3.2 Solução de metanólise

A solução de metanólise foi empregada no ensaio de quantificação de PHB por cromatografia gasosa e teve a seguinte composição:

Composto	Quantidade
Metanol 100%	34 mL
H ₂ SO ₄ concentrado	6 mL

O ácido sulfúrico foi pipetado cuidadosamente e lentamente (gota a gota) na parede do frasco contendo o MetOH em banho de gelo, nunca diretamente na solução. A concentração final do ácido foi de 15% v/v após a diluição.

Para o processo de purificação de DNA plasmidial foram empregadas as soluções abaixo descritas:

4.3.3 GET

Composto	Concentração (mM)
Glucose	50
EDTA	10
Tris-HCl	25

4.3.4 Kcaf

Composto	Concentração (mM)
Acetato de Potássio	3
Ácido Fórmico	1,8

4.3.5 Solução de Lise

Composto	Concentração
NaOH	1,8 M
SDS	1% m/v

Para o processo de extração do RNA as amostras foram tratadas com um tampão que facilita a extração e mantém a integridade do RNA previamente ao tratamento com TRIzol. A sua composição é descrita abaixo (PANKIEVICZ et al., 2016).

4.3.6 Tampão de Extração TRIzol

Composto	Concentração
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM
SDS	0,1 % (m/v)

4.4 Antibióticos

Antibiótico	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)	Ensaio
Estreptomicina	80	80	Todos os ensaios de crescimento envolvendo as estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaR$
Ácido nalidíxico	10	10	Ensaio de conjugação <i>E. coli</i> S 17.1 - <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaR$
Tetraciclina	10	10	Ensaio de conjugação, crescimento de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> com plasmídeos derivados do pBBR1MCS-3

4.5 Crescimento e produção de PHB nas estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae*

4.5.1 Curva de crescimento:

Para o ensaio de crescimento cada uma das estirpes foi crescida em triplicata a partir de três colônias independentes obtidas de uma placa de Petri com cultura fresca (de 3 a 8 dias). As colônias foram inoculadas em meio líquido NFb-malato HPN (3 mL em frascos de vidro estéreis) fazendo duas passagens antes de ser empregadas como pré-inóculos para o ensaio. Após determinada a D.O.₆₀₀ de cada cultura foi calculado o volume necessário para ajustar a D.O.₆₀₀ inicial a 0,02 em um volume final de 10 mL de meio líquido NFb-Malato HPN ou NFb-HPN com fonte de carbono alternativa. Após a inoculação foram realizadas medidas de D.O.₆₀₀ em intervalos de 1 hora, tomando 200

μL de volume de cultura e determinando a D.O.₆₀₀ por meio de um leitor de microplacas (ELX 800 BIO-TEK Instruments) em placas de 96 poços (Greiner BioOne).

Também foi calculado o tempo de geração a partir dos dados de curva de crescimento, o procedimento foi feito no programa Excel®, plotando o Log_{10} do valor de D.O.₆₀₀ versus o tempo. A partir desses gráficos foram eliminados os dados que não apresentaram um comportamento linear e calculou-se a inclinação da reta pela seguinte equação:

$$y = ax + b$$

Onde (a) representa o valor de inclinação da reta que pode ser convertido em taxa de crescimento (μ) por meio da seguinte equação:

$$(\mu) = 2,303 \times (a)$$

Uma vez obtida a taxa de crescimento, o tempo de geração foi calculado dividindo o valor do logaritmo natural de dois “ $\ln(2)$ ” vezes o valor da taxa de crescimento.

4.5.2 Quantificação de PHB por Citometria de Fluxo.

Na avaliação da produção de PHB as duas estirpes foram tratadas seguindo o protocolo de determinação de PHB pela técnica de coloração com vermelho Nilo através de citometria de fluxo (ALVES et al., 2017), tal como se descreve a seguir:

Uma vez que as culturas atingiram os valores de D.O.₆₀₀ de 0,4; 0,8; 1,2 e final (~1,6) foram tomados 100 μL (em triplicata) de cada uma das culturas de SmR1 e ΔphaR crescidas em meio NFb-malato HPN e foram transferidos para microtubos de 1,5 mL esterilizados.

O volume foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 min em centrífuga Minispin (Eppendorf®) a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante líquido e logo após ressuspendeu-se o precipitado de células em 1mL da solução TBAC:EtOH, incubando-o overnight no freezer a -20°C .

Após transcorrido o tempo de incubação as amostras foram descongeladas e adicionou-se 10 µL de uma solução vermelho Nilo (1 µg/mL diluído em DMSO) para uma concentração final em solução de 31,25 µM, misturou-se no vortex por 10 s e imediatamente incubou-se protegido da luz por 5 min. Transcorrido esse tempo a amostra foi novamente centrifugada por 1 min a 13.000 rpm por 1 min (centrífuga Minispin - Eppendorf®) a temperatura ambiente. O sobrenadante com excesso da solução corante foi descartado e o precipitado de células ressuspensionado em 1 mL de solução TBAC (sem etanol).

As medidas foram feitas no citômetro de fluxo Accuri™ C5 da BD Bioscience®. Os parâmetros de mediana da intensidade da fluorescência foram analisados no programa BD Accuri™ C6, empregando o canal FL-2. Os resultados obtidos foram registrados como intensidade de fluorescência normalizada.

4.5.3 Quantificação de PHB por cromatografia gasosa (GC)

Todas as amostras analisadas (SmR1, *ΔphaR* e *ΔphaR* complementada com pMJP01) foram crescidas até uma D.O.₆₀₀ de 1,0, empregando o mesmo protocolo indicado na seção 4.5.1. Rapidamente, 10 mL de cada cultura foram colocados em tubos Falcon de 15 mL e centrifugados por 10 min a 4000 rpm/4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5430). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio NFb-Malato e transferidas a microtubos de 1,5 mL. As amostras foram novamente centrifugadas por 2 min a 13.000 rpm, a temperatura ambiente (centrífuga Minispin - Eppendorf®). Imediatamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram congeladas a -20°C durante 48h.

Transcorrido esse tempo o precipitado de bactérias congelado foi liofilizado por 16h. Misturou-se a amostra liofilizada com 1 mL da solução de metanólise, agitou-se vigorosamente durante 30s em um agitador vortéx e transferiu-se o volume para um tubo Pyrex de vidro borosilicato com tampa rosqueável. Repetiu-se o mesmo passo, adicionando mais 1 mL da solução de metanólise até retirar a totalidade da amostra liofilizada do tubo.

Posteriormente em cada tubo Pyrex com solução de metanólise foram colocados 2 mL de clorofórmio e 0,5 mg de ácido benzóico (padrão interno). Os tubos foram

fechados completamente e aquecidos a 100°C dentro de uma capela de exaustão durante 3,5 h. Durante intervalos de 1 h, os tubos foram retirados rapidamente para mesclar o conteúdo e facilitar a dissolução do liofilizado. Adicionalmente foram realizados controles negativos (somente solução de metanólise) e positivos com 0,5 mg de PHB comercial (Sigma Aldrich®).

Após a metanólise, os tubos foram retirados e deixados a resfriar durante 1h a temperatura ambiente. Logo depois adicionou-se 1 mL de H₂O Milli-Q e agitou-se em vortex por 30 s para facilitar a mistura das fases. Deixou-se incubando por 30 min até obter separação total das fases, a fase aquosa superior foi retirada e a fase orgânica inferior coletada cuidadosamente e transferida para tubos de vidro de 4 mL de capacidade. Adicionou-se sulfato de sódio sólido à fase orgânica para eliminar qualquer traço de H₂O. A solução orgânica foi filtrada através um filtro de algodão moldado na ponta de uma ponteira plástica para pipeta automática de 1 mL, para eliminar os restos do sulfato de sódio. As amostras foram armazenadas em vials de vidro com tampas até serem analisadas por cromatografia gasosa.

As análises foram feitas em cromatógrafo a Gás Varian 450-GC equipado com uma coluna CP-Sil-5CB (10m x 0,53 mm ID). O gás argônio foi usado como gás de arraste na razão de 0,8 mL/min. O injetor foi estabelecido em 250°C e o detector a 275°C. O programa de temperatura no forno foi o seguinte: 50°C por 2 min, de 50°C a 110°C a 20°C/min e finalmente até 250°C na mesma velocidade. Como padrão interno utilizou-se 0,5 mg de ácido benzóico e a análise das áreas dos picos foram feitas com o software Galaxie Versão 1.9. A quantidade de PHB foi normalizada pelo peso da amostra liofilizada e expressado como porcentagem de peso seco (%CDW, % *cell dry weight*).

4.6 Determinação da expressão do gene *phaR* por RT-PCR semi-quantitativa

4.6.1 Extração de RNA

Para avaliar os níveis de expressão do gene *phaR* primeiramente foram feitas extrações de RNA a partir de triplicatas de culturas das estirpes SmR1 e Δ *phaR* crescidas em meio líquido NFb-malato HPN. Os pré-inóculos foram crescidos como descrito na seção 4.5.1. Os cultivos foram inoculados ajustando como ponto de partida o mesmo valor de D.O.₆₀₀ (0,02) em um volume de cultivo de 15 mL. Nos pontos de D.O.₆₀₀ 0,4, 0,6, 0,8

e 1,0 foi tomado 1,5 mL de cultura de cada triplicata e transferidos para microtubos de 1,5 mL estéreis. Imediatamente após os tubos foram centrifugados a 5000 rpm/4°C durante 60 s (centrífuga modelo 2810 - Eppendorf®) o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 300 µL de tampão de extração Tris/EDTA/SDS.

Após ressuspender o precipitado de células, adicionou-se 1 mL de solução TRIzol® e agitou-se vigorosamente durante 15 s. até misturar completamente. As amostras foram incubadas durante 5 min a temperatura ambiente e logo depois se adicionaram 200 µL de clorofórmio puro e misturou-se novamente por 15 s. no vortex, logo depois incubou-se por mais 3 min.

Após incubação as amostras foram centrifugadas durante 5 min a 13.000 rpm (centrífuga Minispin Eppendorf®, temperatura ambiente) e a fase aquosa (aproximadamente 400 µL em cada amostra) foi transferida para um tubo estéril. Imediatamente depois foram adicionados 500 µL de isopropanol, misturou-se por inversão 5 vezes e deixou-se a temperatura ambiente durante 10 min. As amostras foram centrifugadas novamente durante 10 min a 13000 rpm, o sobrenadante foi removido e o pellet contendo o RNA total lavado com 1 mL de EtOH 75%, centrifugou-se novamente por 5 min a 13.000 rpm, eliminou-se o sobrenadante de EtOH e o pellet com RNA foi deixado para secagem por vácuo a temperatura ambiente até eliminar todo o resto de solvente.

Após a secagem as amostras foram solubilizadas em 50 µL de H₂O MilliQ DEPC livre de RNase e 1 µL da amostra foi analisado por eletroforese em gel de eletroforese 0,8% em tampão TBE para verificar a integridade do RNA. Paralelamente foram determinados os parâmetros de qualidade do RNA medindo as absorbâncias no comprimento de onda 260, 280 e 230 nm, calculando a razão de absorbância 260/280 e 260/230 em um espectrofotômetro Nanodrop 2000® da Termo Fischer Scientific®.

4.6.2 Precipitação do RNA com glicogênio

Adicionalmente, visando melhorar os parâmetros de qualidade do RNA foi feita uma precipitação empregando glicogênio da Ambion® (Life Technologies™) e etanol puro, o qual consiste num tratamento para a eliminação dos restos de contaminantes da extração com TRIzol. Para cada 50 µL de amostra de RNA foram empregados 5 µL de

acetato de sódio 3M e 1 μL de glicogênio, a mistura foi agitada no vortex rapidamente e incubada a -20°C durante 1h. Logo após foi centrifugada por 30 min a 13.000 rpm.

Todo o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 750 μL de etanol 70%, centrifugou-se novamente na centrífuga Minispin® a 13.000 rpm por mais 5 min. Depois o sobrenadante foi descartado novamente e a amostra foi seca a vácuo até eliminar todo o resto de etanol. Após o tratamento todas as amostras foram solubilizadas em 20 μL de H_2O DEPC e determinou-se novamente os parâmetros de qualidade.

4.6.3 Tratamento com DNase e preparação de cDNA

Para eliminar uma possível contaminação com DNA das amostras extraídas foi empregada a enzima DNase I, RNase Free da Thermo Scientific® utilizando o tampão fornecido pelo fabricante e empregando o protocolo disponível na literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Em um microtubo de 200 μL de capacidade foram colocados 20 μL de amostra de RNA, 5 μL de tampão de reação, 1 μL de DNase e 24 μL de H_2O DEPC. As amostras foram incubadas em termociclador Veriti da Applied Biosystem® nas seguintes condições: 1h por 37°C e logo após 10 min a 65°C (inativação da enzima). Após o processo de inativação foram determinados novamente os parâmetros de qualidade de RNA no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 e feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% a 70 mV durante 30min.

Para realizar a síntese de cDNA foi empregado o Kit High Capacity RNA-to-cDNA™ da Thermo Fisher Scientific® utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante nas seguintes concentrações:

Componente	Sistema de Reação (μL)	Sistema Controle (μL)
Tampão RT Mix (2X)	10	10
Enzyme Mix (20X)	1	-
RNA	volume suficiente para 1 μg	volume suficiente para 1 μg
H_2O DEPC	volume necessário para completar 20 μL	volume necessário para completar 20 μL

Um total de 8 amostras foram processadas para realizar o cDNA (uma de cada ponto de tomada de amostra de cultivo das duas estirpes). O sistema controle foi feito com todos os componentes da reação menos a mistura de enzima. Esse controle descarta uma possível contaminação por DNA que tenha resistido ao tratamento com DNase.

4.6.4 Reação de PCR e avaliação dos níveis de expressão de *phaR*

O ensaio de PCR foi feito empregando 1 µL de uma diluição 1/10 do cDNA e no termociclador Veriti (Applied Biosystems), empregando 15, 20 e 25 ciclos de amplificação. Os primers RT *phbF* e 16S para *Herbaspirillum seropedicae* foram utilizados e a proporção de reagentes e condições são mostradas abaixo:

Mix da reação:

Componente	Quantidade (µL)
H ₂ O MQ Estéril	14
Tampão HF (10X)	2
dNTPs (5mM)	0,8
Primer 1 (10 pmol)	1
Primer 2 (10 pmol)	1
cDNA	1
Phusion HF DNA	0,2
Polymerase	

Condições da PCR:

Etapa	Temperatura (°C)/Tempo (s)	Ciclos
Início	96/15	1
Desnaturação	96/15	
Anelamento	60/30	30
Extensão	72/15	
Final	4/∞	1

O resultado das reações foi verificado por eletroforese em agarose 1,5% com 2 µL de amostra e revelado em brometo de etídio (10 µg/mL) para visualizar o tamanho da banda amplificada e sua intensidade.

4.7 Complementação do mutante $\Delta phaR$

4.7.1 PCR para amplificação do gene *phaR* de *H. seropedicae* SmR1

O gene *phaR* juntamente com um fragmento da região a jusante e a montante foi amplificado a partir do DNA da estirpe SmR1, empregando os primers Fw_phaRc_Hs e Rev_phaRc_Hs. A PCR foi realizada empregando os reagentes as condições descritas abaixo.

Componentes da reação:

Componente	Quantidade (μ L)
H2O MQ Estéril	12
Tampão HF (5X)	4
dNTPs (5mM)	0,8
Primers 1 e 2	1
DNA Molde	1
Phusion DNA Polimerase	0,2

Condições da PCR:

Etapa	Temperatura (°C)/Tempo (s)	Ciclos
Início	96/15	1
Desnaturação	96/15	30
Anelamento	55/30	
Extensão	72/30	
Final	4/ ∞	1

Após a PCR todo o volume da reação foi aplicado em gel de eletroforese de agarose 0,8% com tampão TAE (1X). Após 1h de corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e verificou-se a presença de uma única banda de 1.151 pb, indicando que houve a amplificação do fragmento como esperado. O fragmento foi cortado do gel, pesado e colocado num microtubo de 1,5 mL para a sua purificação utilizando o KIT DNA Gel

Extraction illustra® GFX da GE HealthCare® segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. A amostra purificada foi eluída em 30 µL de H₂O MQ estéril.

4.7.2 Digestão do fragmento *phaR*

Em um microtubo de 200 µL foram colocados os seguintes reagentes nas proporções descritas abaixo:

Componente	Quantidade (µL)
H ₂ O MQ	16
Fragmento DNA <i>phaR</i>	28
Tampão Tango 10X	5
Fermentas®	
<i>PstI</i> -Fermentas®	0,5
<i>SacI</i> -Fermentas®	0,5

O sistema foi incubando overnight a 16°C, após o tempo de reação as enzimas foram inativadas por aquecimento a 80°C por 10 min no termociclador Veriti da Thermo Fischer Scientific®

4.7.3 Precipitação e recuperação do DNA

Após inativação enzimática, adicionou-se aos 50µL da amostra 5 µL de acetato de potássio 5 M e 100 µL de EtOH puro. Misturou-se por vortex durante 10 s e incubou-se durante 30 min a -80°C. Após o tempo de incubação a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm/4°C durante 15min numa centrifuga Eppendorf® refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet lavado com 1mL de EtOH 70% a frio. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e depois foi retirado todo o sobrenadante de EtOH. A amostra foi seca a temperatura ambiente e dissolvida em 10 µL de H₂O MQ.

4.7.4 Transformação e purificação de DNA Plasmidial

4.7.4.1 Preparação de bactéria competente

O processo para a preparação de bactérias competentes e transformação foi feito de acordo com o protocolo descrito na literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) Todas

as soluções empregadas foram preparadas com H₂O MQ, esterilizadas e mantidas em refrigeração até seu uso.

Colônias isoladas de *E. coli* Top10 foram inoculadas em frasco de vidro estéreis com 3 mL de meio LB (sem antibiótico) e incubadas *overnight* a 37°C com agitação orbital de 160 rpm. Após o tempo de incubação, 500 µL da cultura foram inoculados em 50 mL de meio LB em frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubados no shaker a 37°C/160 rpm até atingir a D.O.₆₀₀ de 0,3.

Uma vez atingida a D.O.₆₀₀ desejada, as células foram transferidas a um tubo de 50 mL estéril e centrifugou-se a 5000 rpm/4°C durante 10 min (centrífuga refrigerada Eppendorf® 5420). O sobrenadante foi descartado e as células imediatamente colocadas em um banho de gelo. Logo depois foram adicionados 20 mL (metade do volume) de uma solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 0,1M e as células foram suspensas por pipetagem. Após a suspensão, o volume foi completado para 40 mL com o restante da solução, misturado e levado para centrifugar novamente nas mesmas condições descritas previamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 25 mL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M, mantidas no gelo durante mais 20 min, e centrifugadas novamente nas mesmas condições.

Após a centrifugação o sobrenadante foi eliminado e as células foram suspensas em 1 mL de solução de CaCl₂ 0,1M com glicerol a 15%, suspensas e distribuídas em alíquotas de 100µL em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -80°C até seu uso.

4.7.4.2 Transformação plasmidial

O protocolo de transformação das células de *E. coli* Top10 com o plasmídeo pBBR1MCS-3 foi feito empregando a técnica de choque térmico segundo o descrito na literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Uma alíquota de 100 µL de células de *E. coli* Top10 armazenadas a -80°C foi retirada do freezer e colocada em gelo até descongelar completamente. Às células adicionaram-se 2 µL de plasmídeo e incubou-se durante 30 min no gelo. Após o tempo de incubação, as células foram transferidas rapidamente para um banho de água a 42°C por 90 s Imediatamente após foram transferidas novamente para o gelo por mais 2 min e

depois adicionou-se 200 µL de meio LB e deixou-se incubando na estufa durante 1h a 37°C.

Todo o volume foi semeado em placas com meio LA e tetraciclina a 10 µg/mL. Após 16h foi verificado o crescimento de colônias. As placas foram armazenadas na geladeira a 4°C até seu uso.

4.7.4.3 Minipreparação plasmidial

A extração foi feita segundo o método de lise alcalina encontrado na literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) da seguinte forma: 4 mL de meio LB contendo o antibiótico de resistência foram inoculados com colônias isoladas de *E. coli* Top10 contendo o plasmídeo e após 16 h de incubação no shaker a 37°C/160 rpm foi verificado o crescimento pela turbidez do meio de cultura (foi feito também um controle negativo contendo *E. coli* Top10 sem plasmídeo).

O volume de 1,5 mL de cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, centrifugado durante 75 s a 13.000 rpm numa centrífuga Minispín Eppendorf®. O sobrenadante contendo o meio foi eliminado completamente e o precipitado de células foi suspenso em 150 µL de GET/RNase (1 mL de GET/1 µL de RNase). Incubou-se por 5 min a temperatura ambiente e após transcorrido o tempo foi adicionado 150 µL de solução de lise. Inverteu-se o tubo cuidadosamente 10 vezes e adicionou-se mais 150 µL de Kcaf invertendo novamente a amostra até obter um precipitado branco.

Imediatamente depois, foram adicionados 100 µL de uma mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1 e deu-se um pulso no vortex por 3 s, depois foi centrifugado durante 5 min a 13.000 rpm na centrífuga Minispín da Eppendorf®. Depois da centrifugação o sobrenadante aquoso (aproximadamente 400 µL) foi retirado e transferido para um novo tubo e foram adicionados 250 µL de isopropanol. Agitou-se brevemente no vortex e incubou-se em gelo por 20 min.

Após o tempo de incubação a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1mL de EtOH 70% e centrifugado novamente por 5 min. Eliminou-se todo resto do etanol e a amostra foi seca por vácuo até

desaparecer qualquer resto de líquido. O DNA seco foi dissolvido em 50 μL de H_2O MilliQ estéril.

4.7.5 Digestão de DNA com enzimas de restrição

A solução com o plasmídeo pBBR1MCS-3 foi digerida com as duas enzimas (PstI e SacI) da Fermentas® empregando o protocolo fornecido pelo fabricante e fazendo uma digestão em duas etapas partindo com dois sistemas, cada um deles foi preparado da forma descrita abaixo:

Componente	Sist. Preparativo Quantidade (μL)	Sist. Analítico Quantidade (μL)
H_2O MQ	14	7,6
Plasmídeo	30	10
Tampão Tango 10X	5	2
PstI	0,5	0,2
SacI	0,5	0,2
RNase	0,5	0,2

Após a incubação overnight foi feita uma eletroforese em agarose 0,8% empregando 2 μL de cada sistema para verificar a linearização do plasmídeo resultado do corte da enzima com a qual foi incubada. Após obter resultados positivos para ambos sistemas separadamente, o sistema preparativo foi incubado com 0,5 μL da enzima SacI overnight. No dia seguinte foi feita a inativação das duas enzimas (10min a 80°C) seguida de precipitação com acetato de sódio 5M e etanol como foi descrito no item 4.7.3.

4.7.6 Ligação de DNA

Após o tratamento enzimático e purificação do plasmídeo e o fragmento foram criados dois sistemas para realizar a ligação de ambos elementos (de ligação e controle). O sistema controle foi utilizado para verificar a presença de algum DNA contaminante ou recircularização de plasmídeos digeridos apenas com uma das enzimas. Os sistemas foram preparados da seguinte forma:

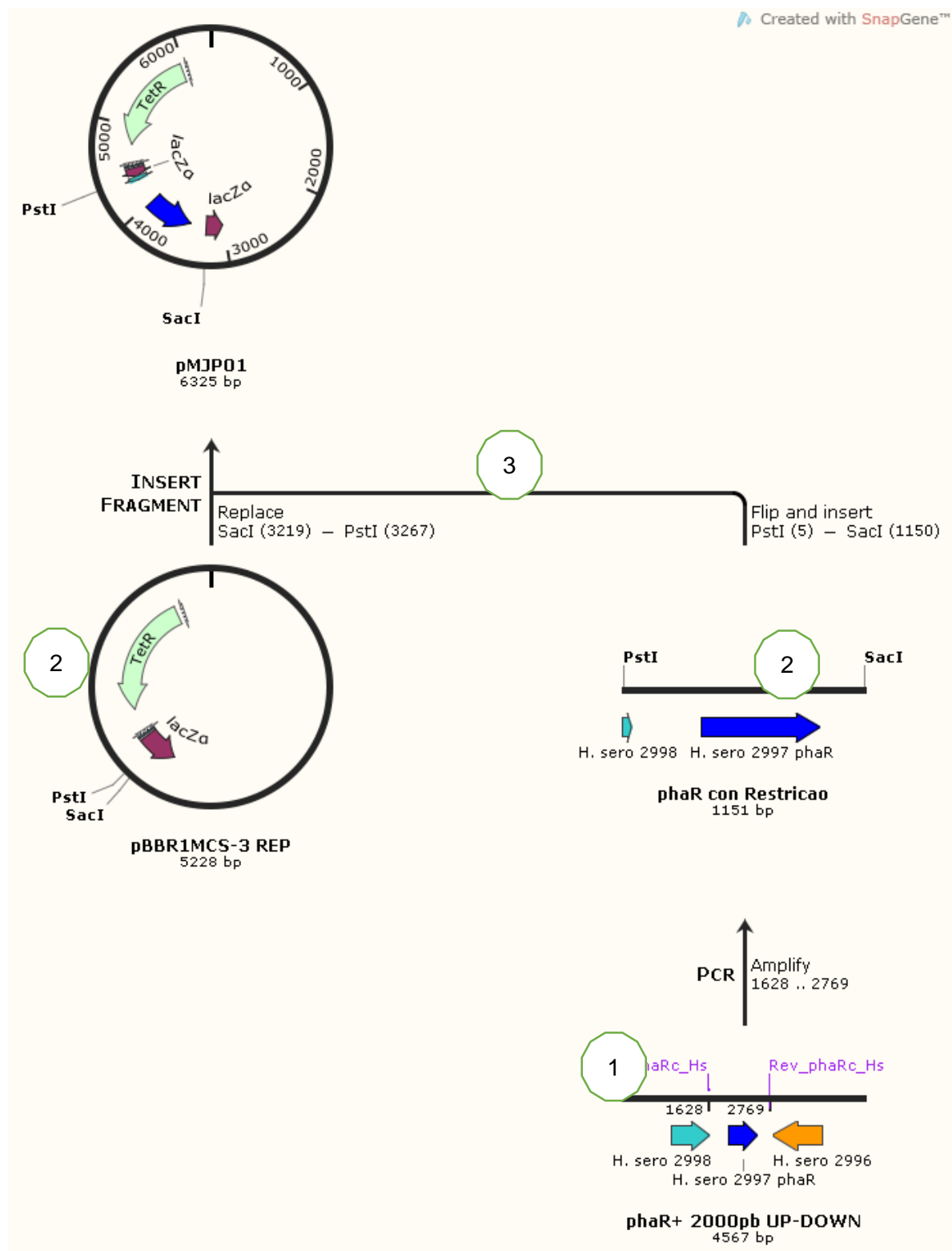
Componente	Sist. Controle (μL)	Sist. de Ligação (μL)
H_2O MQ	6,5	1,5
Vetor	3	3
Tampão T4 (10X)	1	1
T4 DNA Ligase Termo Fisher Scientific	0,5	0,5
Inserto	0	4

O Sistema foi incubado overnight a 16°C e logo após foi feita inativação a 70°C por 5 min. Uma alíquota de 100 µL de *E. coli* Top10 quimiocompetente foi transformada com 2 µL da reação de ligação, seguindo o protocolo descrito na seção 4.7.4.2. Também foi feita transformação da *E. coli* S17-1 com o plasmídeo pBBR1MCS-3 para serem usadas posteriormente como controle da conjugação na seguinte seção.

A inserção do fragmento *phaR* provoca a interrupção do gene *lacZ* no plasmídeo, por tanto a seleção de cepas positivas para o gene *phaR* foi feita por observação das colônias em placas de LB com tetraciclina (antibiótico de resistência), Xgal (40 µg/mL) e 0,1 mM de IPTG, sabendo que as colônias brancas serão positivas e as azuis negativas (LacZ ativo). As colônias selecionadas como positivas para o inserto foram crescidas em meio LB com tetraciclina, centrifugadas e armazenadas em glicerol 50% até o uso.

Todo o processo pode ser resumido rapidamente na seguinte figura obtida a partir do programa Snapgene, tal como se mostra na Figura 8.

Figura 8. Resumo da clonagem do fragmento phaR no plasmídeo pBBR1MCS-3 REP



Na figura são mostrados de forma gráfica a sequência de passos realizados até lograr a clonagem do fragmento *phaR* no vetor pBBR1MCS-3REP: 1) amplificação por PCR, 2) restrição com enzimas *Pst*I e *Sac*I, 3) Ligação dos fragmentos e obtenção de pMJP01.

4.7.7 Conjugação biparental entre *E. coli* e *H. seropedicae*

As estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de *H. seropedicae* foram inoculadas em 3 mL de meio NFb-malato HPN com estreptomicina e incubadas overnight no shaker a 30°C/120 rpm. Paralelamente foram incubadas também em meio LB com tetraciclina colônias de *E. coli* S17-1 contendo os plasmídeos pMJP01 e pBBR1MSC-3 a 37°C/160 rpm.

No dia seguinte, foram inoculados diferentes volumes das estirpes de *H. seropedicae* (25, 50, 75 μ L) em frascos com 2,5 mL de NFb-Malato HPN e estreptomicina empregando os pré-inóculos crescidos na noite anterior. Foram usadas as mesmas condições de temperatura e agitação e deixou-se incubando até atingir uma D.O.₆₀₀ no intervalo de 0,2-0,25. Paralelamente, foram crescidas também as estirpes de *E. coli* S17-1 com os plasmídeos a partir de 25 μ L de pré-inóculos feitos no dia anterior incubando-os em 2 mL de meio LB com tetraciclina e nas mesmas condições descritas de temperatura e agitação.

Cada uma das estirpes de *H. seropedicae* foi misturada com uma estirpe de *E. coli* S17-1 em microtubos de 1,5 mL estéreis em duas proporções diferentes de volumes. No primeiro caso, 100 μ L de cultura de *H. seropedicae* foi misturada com 2 μ L de *E. coli* S17-1, no segundo 50 μ L de *H. seropedicae* com 15 μ L de *E. coli* S.17-1. O volume total foi inoculado na forma de uma gota em placas com Meio NFb-Malato HPN:LA, na proporção de 3:1, sem antibiótico. As placas foram incubadas por 24h a 30°C. Após o tempo de incubação, as bactérias foram removidas da placa e ressuspensas em 1 mL de NFb-Malato em diluições seriadas de $1/10^1$, $1/10^2$ e $1/10^3$ e semeadas em placas com meio NFb-Malato HPN com estreptomicina, ácido nalidíxico e tetraciclina, incubadas por 48h a 30°C.

As diferentes combinações deram origem a 4 estirpes novas para as quais foi criada uma nova nomenclatura tal como se descreve a seguir:

Nomenclatura	Estirpe conjugada
Cepa A	SmR1 α pMJP01
Cepa B	SmR1 α pBBR1MCS-3
Cepa C	$\Delta phaR$ α pMJP01
Cepa D	$\Delta phaR$ α pBBR1MCS-3

As diferentes estirpes foram crescidas em meio líquido NFb-malato HPN e armazenadas em meio semi-sólido até seu uso.

4.8 Sequenciamento de DNA da região *phaR* no plasmídeo pMJP01

A partir de um estoque em glicerol de *E. coli* Top10 transformada com o plasmídeo pMJP01 foi crescida uma cultura em 4 mL de meio LB com tetraciclina. O plasmídeo pMJP01 foi preparado seguindo o protocolo descrito na seção 4.7.4.3. Após a extração do plasmídeo foi preparada uma reação de sequenciamento com dideoxi-nucleotídeos fluorescentes empregando o Kit BigDye® Terminator da Applied Biosystems® e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante: 5 µL do plasmídeo foram combinados com 0,5µL dos primers M13 Forward ou Reverse (10 pmol), 3 µL de Tampão Save Money, 1 µL de BigDye Terminator e 0,5 µL de H₂O MQ estéril até obter um volume final da reação de 10 µL, as condições para extensão foram as seguintes:

Etapa	Temperatura (°C)/Tempo (s)	Ciclos
Início	96/15	1
Desnaturação	96/15	30
Anelamento	50/15	
Extensão	60/240	
Final	4/∞	1

Após o processo de extensão das cadeias foi feita uma precipitação com acetato de amônio 7,5M, adicionando 10 µL de H₂O MQ, 2µL de acetato de amônio 7,5M; 60 µL de etanol absoluto e misturando rapidamente no vortex. A reação foi incubada por 20min a -80°C e logo depois centrifugada por 15min/4°C a 10.300 rpm numa centrífuga Eppendorf® 5804. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70%, ressuspendido por vortex e centrifugado novamente 5 min a 13.000 rpm numa centrífuga Minispin® (Eppendorf®). Descartou-se o sobrenadante de etanol e a amostra foi seca a temperatura ambiente no vácuo até eliminar todo o resto de etanol.

Logo depois de seca, a amostra foi dissolvida em 4 µL de Formamide Loading Dye, desnaturada por 2 min a 96°C e submetida a eletroforese num sequenciador automático de DNA ABI-3500 da Applied Biosystem®. As sequencias obtidas em arquivo formato FASTA foram analisadas com o Software BioEdit®. A combinação das duas sequências foi posteriormente comparada no GenBank para verificar que a sequência coincida 100% com a sequência do gene *phaR* de *H. seropedicae* SmR1.

4.9 Análise transcriptômica do mutante Δ phaR.

As amostras de RNA a partir das estirpes SmR1 e Δ phaR de *H. seropedicae* foram obtidas a partir de colônias independentes e em triplicatas, crescidas da mesma forma como descrito na seção 4.5.1. Nesse caso, o volume de meio NFb-malato HPN foi ajustado a 25 mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL, incubado no shaker a 30°C a 120 rpm até atingir a D.O.₆₀₀ de 1,0. Uma vez atingida a cultura foi transferida a um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 4°C/5.000 rpm por 10 min. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e a extração de RNA foi feita da mesma forma como foi descrito na seção 4.5.1.

Neste caso os parâmetros de qualidade do RNA se mantiveram dentro dos permitidos e não foi necessária uma precipitação com glicogênio. Portanto, procedeu-se com o procedimento para a preparação da biblioteca.

4.9.1 Depleção de rRNA

A depleção foi feita empregando o Kit MICROBExpress™ da AMBION de acordo com as instruções do fabricante.

4.9.2 Construção e sequenciamento da biblioteca

A biblioteca foi construída a partir do RNA depletado empregando o kit Ion Total RNAseq V2 e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas no equipamento Ion Proton® da Thermo Fisher Scientific. Os *reads* foram armazenados em formato FASTQ.

4.9.3 Análise Bioinformática

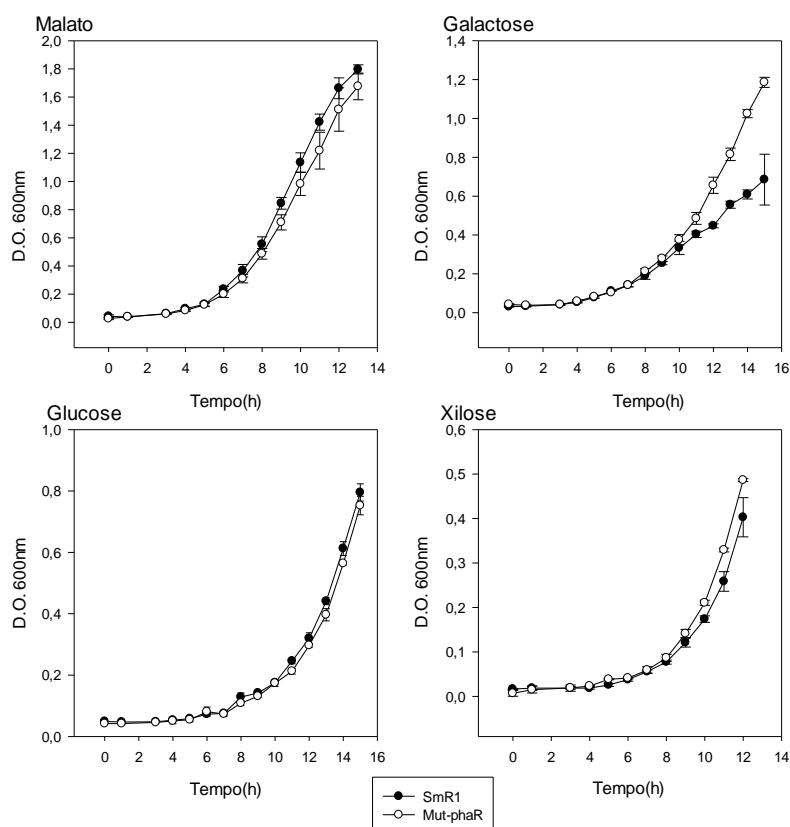
As análises bioinformáticas foram feitas empregando o Software CLC 7.0 a poda dos *reads* foi feita com um Quality Score de 0,05; os valores de *Length Fraction* e *Similarity Fraction* foram estabelecidos em 0,9 e 0,8, respectivamente. Após a poda o mapeamento foi feito utilizando o próprio CLC ou o software SHRiMP e uma vez obtidos os *reads* mapeados foram feitas análises estatísticas empregando os pacotes estatísticos para R da Bioconductor EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) e DESeq1 (ANDERS; HUBER, [s.d.]), a partir das análises se consideram como valores de expressão significativos aqueles que tem um valor de $p < 0,05$ e um valor de Log_2 (*Fold-change*) maior que 1 e menor que -1. Após a filtragem baseado nesses parâmetros foi feito um cruzamento entre os dados obtidos a partir de todas essas ferramentas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento e síntese de PHB das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae*.

Com a finalidade de verificar as diferenças no metabolismo e produção de PHB ocasionadas pela deleção do gene *phaR*, avaliou-se o crescimento das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ empregando como fontes de carbono o ácido málico ou monossacarídeos como glucose, galactose e xilose, os resultados são mostrados na figura 9.

Figura 9. Curva de crescimento das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae* crescidas em diferentes fontes de carbono.



Os ensaios foram feitos em triplicata biológica, com inoculação de bactérias suficiente para começar na D.O.₆₀₀ de 0,01 e na temperatura e agitação orbital de 30°C e 120 rpm. Em intervalos de 1h, amostras de 200 µL foram coletadas e transferidas a microplacas para determinar a D.O.₆₀₀. Os resultados foram analisados pelo software Sigmaplot® V.12.

Observou-se que o crescimento de ambas as estirpes foi similar nas fontes de carbono avaliadas, com exceção da galactose. Nessa fonte de carbono a estirpe parental SmR1 apresentou menor crescimento do que o mutante $\Delta phaR$ durante a fase exponencial.

Com a finalidade de confirmar os resultados obtidos, foi calculado também o tempo de geração de cada uma das estirpes incubadas nos diferentes meios de cultura, os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Tempo de geração das estirpes cultivadas em diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	T. de geração SmR1(h)	T. de geração $\Delta phaR$ (h)
Malato	1,73±0,056	1,63±0,06
Glucose	2,30±0,07	2,37±0,19
Xilose	1,79±0,09	1,64±0,09
Galactose*	2,28±0,037	1,64±0,09

(*) indica que houve diferenças significativas entre as duas estirpes crescidas no meio (t-teste, pvalue $\leq 0,05$).

Como é possível observar através dos tempos de geração, o malato e a xilose foram as melhores fontes de carbono para o cultivo de ambas as estirpes, pois apresentaram os menores tempos de geração. As diferenças no crescimento observadas entre as duas estirpes quando cultivadas em galactose acabam sendo confirmadas também no cálculo de tempo de geração. Essas variações no padrão do crescimento poderiam ser atribuídas a diferenças metabólicas derivadas da deleção do gene *phaR*. Esse resultado deve ser corroborado novamente numa nova análise de crescimento feita também com a cepa obtida a partir da complementação do mutante $\Delta phaR$.

Catalán e colaboradores avaliaram o crescimento de *H. seropedicae* Z67 em diferentes fontes de carbono. Eles ressaltam a capacidade dessa bactéria utilizar diferentes substratos e por empregar a via Entner-Doudoroff para o catabolismo de carboidratos. Esses autores também demonstraram a capacidade de *H. seropedicae* crescer em fontes de carbono tais como glucose, xilose, manitol, galactose e ácido succínico, e também a

capacidade de produzir PHB em todas essas fontes de carbono. A suplementação do meio com ácido nonanóico levou a produção de uma mistura de polihidroxibutirato-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) (CATALÁN et al., 2007).

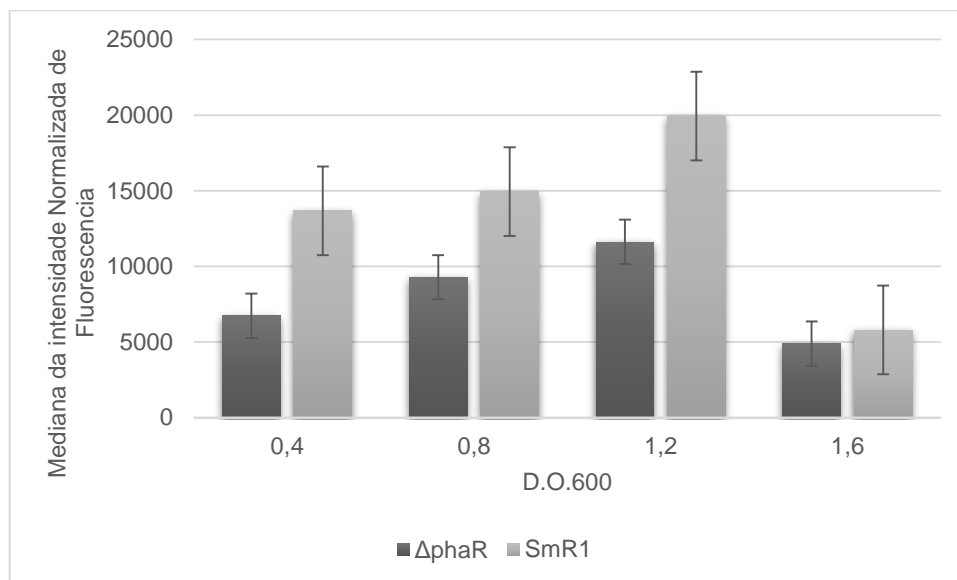
Os polihidroxicanoatos são produzidos a partir de uma ampla variedade de substratos e fontes renováveis (sacarose, amido, celulose, triglicerídeos, hemicelulose, etc.), subprodutos (melaço, soro, glicerol, licor de milho, farelo de arroz), ácidos orgânicos (ácido propiônico, ácido 4-hidroxibutírico), fontes fósseis (metano, óleo mineral) e rejeitos (águas residuais, moinho de óleo de palma, lodos ativados) (STEINBÜCHEL; WIECZOREK; KRÜGER, 1996).

Os primeiros já têm sido usados para a produção industrial, porém ainda há uma série de limitações econômicas principalmente pelo alto custo das matérias-primas a serem fermentadas. Portanto, desenvolver novas fontes que sejam mais econômicas e competitivas tornaria o processo de produção de PHB por bactérias mais promissor. O resultado das duas estirpes terem crescido no meio com xilose é importante, pois a xilose é um dos componentes principais da hemicelulose que representa uma das fontes de carbono mais abundantes na natureza (URTUVIA et al., 2014). É necessário então avaliar se a produção de PHB nessa fonte seria tão eficiente quanto a produção em malato e também analisar novas fontes renováveis e com uma alta disponibilidade de xilose que possam ser empregadas como substrato.

A primeira estratégia adotada para se avaliar a produção de PHB foi o método desenvolvido por Alves e colaboradores em 2016 que analisa a produção de PHB por citometria de fluxo (ALVES et al., 2017). Nesta técnica, a quantidade de PHB é determinada pela quantidade de fluorescência de cada célula da amostra após serem coradas com vermelho do Nilo. O uso desta técnica justifica-se pela sua rapidez, já que não precisa de procedimentos complicados ou laboriosos como a técnica de metanólise seguida de cromatografia gasosa.

Para a primeira avaliação foram empregadas amostras coletadas em quatro pontos de D.O.₆₀₀ ao longo do crescimento em meio malato e foram preparadas segundo o protocolo descrito por (ALVES et al., 2017). Os dados obtidos pela citometria (intensidade normalizada de fluorescência) foram plotados na Figura 10.

Figura 10. Produção de PHB nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e mutante $\Delta phaR$ crescidas em meio NFb-malato HPN.



A figura mostra os valores de intensidade normalizada de fluorescência das estirpes SmR1 e $\Delta phaR$ em diferentes pontos de D.O.₆₀₀. O valor final foi de aproximadamente 1,6. Os dados de intensidade normalizada de fluorescência foram analisados três vezes para cada triplicata biológica. As diferenças observadas entre as duas estirpes foram estatisticamente significativas (t-test, p value=0,027).

De acordo com a figura 10, observa-se que nos primeiros três pontos avaliados a estirpe parental SmR1 apresentou valores significativamente maiores de intensidade de fluorescência do que o mutante $\Delta phaR$, portanto presume-se que a estirpe parental acumule maiores quantidades de PHB. Os valores mais altos de produção de PHB ocorreram quando a cultura atingiu a D.O.₆₀₀ de 1,2, sendo que a partir desse ponto começou a diminuir a quantidade de PHB. Esse dado é importante para a análise transcriptômica, considerando que o valor de D.O.₆₀₀ escolhido para a tomada de amostra foi no ponto 1,0. Por tanto, acredita-se que como as duas estirpes estão acumulando PHB nessa fase será possível avaliar a transcrição dos genes implicados na síntese de PHB assim como também as diferenças metabólicas no mutante $\Delta phaR$ que impedem o acúmulo do polímero.

No trabalho publicado por Catalán e colaboradores, avaliou-se a produção de PHB da estirpe Z67 de *Herbaspirillum seropedicae* em meio LGI com glucose, os resultados mostraram que a quantidade de PHB chegou a representar até 36% do peso seco após 63 horas de crescimento. No nosso estudo, a avaliação da produção de PHB foi sempre empregando malato como fonte de carbono e as avaliações foram feitas num valor de D.O.₆₀₀ mais baixo, os dados obtidos a partir da análise de citometria de fluxo são expressados em intensidade normalizada de fluorescência a diferença da técnica de GC que expressa em termos de quantidade de PHB baseada no peso seco, porém existe uma alta correlação entre as duas técnicas ($R_2=0,99$) na determinação do acúmulo desse polímero (ALVES et al., 2017).

O principal objetivo era avaliar como a mutação poderia afetar o crescimento em fontes de carbono que já foram estudadas e que se sabe que *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 é capaz de crescer. Isso permitiu confirmar que o mutante $\Delta phaR$ produz menos PHB que a estirpe selvagem. Isso é considerado um paradoxo, pois até agora PhaR tem sido considerada como uma proteína repressora da transcrição dos genes implicados na síntese de PHB, segundo a maioria dos modelos bacterianos estudados. Em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 também já foi demonstrado o mesmo efeito repressor (KADOWAKI et al., 2011).

Esse estudo confirmou que a maior parte do PHB se acumula somente quando a bactéria começa a entrar na fase estacionária, condições nas quais geralmente existe alguma limitação de compostos necessários para assegurar a continuidade no aumento da população de microrganismos. Essa condição tem sido tomada como consenso em praticamente todos os estudos que avaliam microrganismos produtores de PHB e geralmente o composto que tem sido usado como fator desencadeante é a falta de nitrogênio (SUN et al., 2002).

5.2 Determinação dos níveis de expressão do gene *phaR*

Com o objetivo de determinar qual seria a melhor fase de crescimento para extrair amostras de RNA para a análise transcriptômica do mutante $\Delta phaR$, amostras de cultura da estirpe parental e mutante foram extraídas em diferentes pontos de D.O.₆₀₀: 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0.

Após o processo de extração com TRIzol foi verificada a integridade do RNA por eletroforese e por análise espectrofotométrica. As amostras foram submetidas a precipitação com glicogênio e após esse processo foram tratadas com DNase e novamente foram determinados os parâmetros de qualidade por espectrofotometria. Os resultados são mostrados na tabela 3

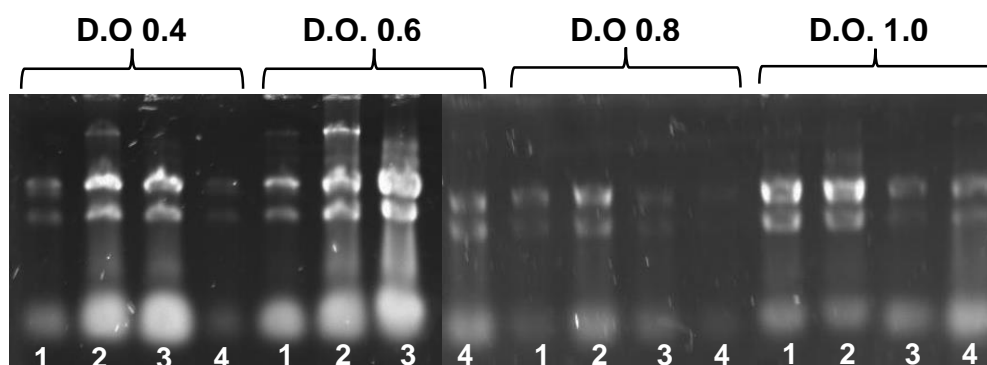
Tabela 3. Qualidade das amostras de RNA empregadas para a síntese de cDNA.

AMOSTRA- D.O. ₆₀₀	TRIPLICATA	[RNA] NG/ μ L	ABS. 260	ABS. 280	260/280	260/230
SmR1-0,4	1	88,5	2,214	1,25	1,47	1,48
	2*	196,7	4,918	2,568	1,91	1,73
	3	140,6	3,514	1,759	2,0	1,61
Δ phaR-0,4	1**	34,5	0,862	0,468	1,84	0,89
SmR1-0,6	1	149,5	3,737	1,893	1,97	1,6
	2*	157,7	3,942	1,980	1,99	1,67
	3	96,6	2,414	1,206	2,0	1,49
Δ phaR-0,6	1*	125,5	3,138	1,563	2,01	1,54
SmR1-0,8	1	239,2	5,974	2,972	2,01	1,85
	2*	295,1	7,376	3,633	2,03	1,88
	3	257,3	6,432	3,196	2,01	1,87
Δ phaR-0,8	1*	72,8	1,821	0,924	1,97	1,35
SmR1-1,0	1	4,4	0,111	0,014	1,18	0,22
	2*	370,7	9,268	4,630	2,0	1,96
	3	413,2	16,331	5,320	1,94	1,94
Δ phaR-1,0	1*	167,4	4,186	2,082	2,01	1,76

A tabela mostra os valores de concentração de RNA junto com os dados de razão de absorbância 260/280 e 260/230, sendo que o primeiro é um indicador de qualidade e o segundo de contaminação. Valores >1,8 para ambas razões representam amostras satisfatórias. As extrações na estirpe SmR1 foram feitas por triplicata, porém para o mutante Δ phaR só foi feita uma extração em cada D.O. (empregada com controle). As amostras marcadas com (*) representam aquelas que foram selecionadas como molde para a síntese de cDNA, a amostra (**) representa a única amostra que mesmo tendo uma concentração muito baixa foi empregada também para esse ensaio.

O gel de electroforese em agarose 0,8% das amostras de RNA após a extração com TRIzol é mostrado a continuação na figura 11.

Figura 11. Qualidade do RNA das amostras obtidas após extração com TRIzol



A figura mostra a eletroferese em gel de agarose 0,8% em tampão borato após o tratamento com brometo de etídio para revelar as bandas. Observa-se quatro bandas por cada ponto de D.O. avaliado, sendo que as primeiras 3 representam o RNA das amostras SmR1 (triplicata) e a 4ta representa a única amostra de RNA extraída do mutante $\Delta phaR$. Nenhuma das amostras apresentou bandas de degradação e por tanto algumas dessas amostras foram selecionadas para fazer a síntese do cDNA.

A precisão da avaliação da expressão gênica tem mostrado ser seriamente afetada pela quantidade e a qualidade do RNA. A pureza e integridade são elementos críticos para as análises posteriores sobre o nível de expressão dos genes. Por isso quando são empregados métodos de quantificação de qualidade com um espectrofotômetro UV/VIS a avaliação deve ser feita em vários comprimentos de onda: 240 nm (absorção de fundo, e possíveis contaminantes), 260 nm (específico para ácidos nucleicos), 280 nm (específico para proteínas) e 320 nm (absorção de fundo de contaminantes). A análise desses parâmetros é imprescindível para se escolher amostras de RNA de alta qualidade para análises de RT-PCR semi-quantitativa, microarranjos, ensaios de proteção de ribonucleases, hibridização *in situ*, análise de Northern Blot, mapeamento de RNA e construção de bibliotecas de cDNA (FLEIGE; PFAFFL, 2006).

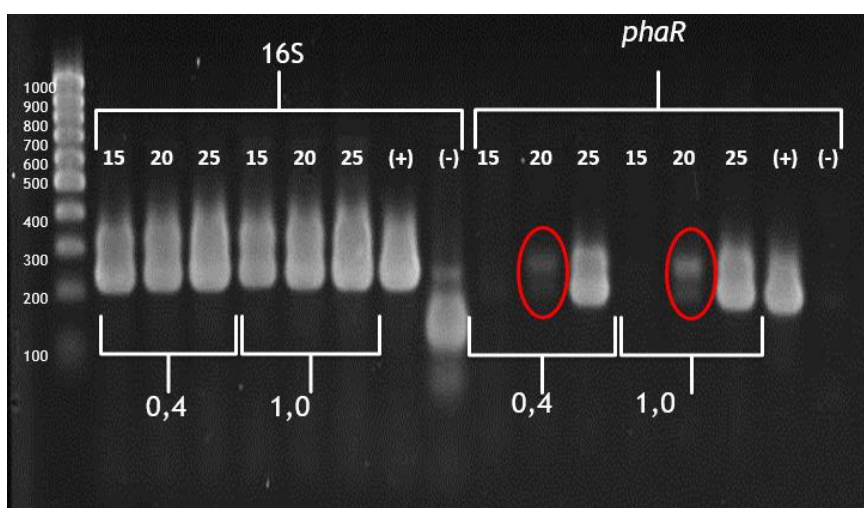
Os parâmetros de qualidade das amostras extraídas para a análise por RT-PCR semi-quantitativa se mostraram um pouco abaixo dos valores de qualidade já estabelecidos. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A análise do padrão de bandas revelou que as amostras de RNA se encontrava em

bom estado, livre de degradação (**figura 11**). Outro fator a levar em conta sobre o efeito da qualidade do RNA na PCR é justamente os tamanhos dos fragmentos amplificados. A maioria dos trabalhos estabelece que a preferência por um RNA de boa qualidade é proporcional ao tamanho do fragmento que se quer amplificar por PCR, ou seja, que para fragmentos de mais de 400 pb é essencial ter um RNA de ótima qualidade e sem contaminação, mas para produtos entre 75-250 pb pode-se utilizar amostras de RNA com qualidade inferior (FERRE, 1992; MARONE et al., 2001).

Nenhum dos fragmentos amplificados na nossa análise superou os 300 pb e a totalidade das amostras selecionadas para a síntese de cDNA foram aquelas que tiveram uma boa concentração de RNA e os melhores parâmetros de qualidade, por tanto continuou-se com a reação de síntese de cDNA e avaliação por PCR.

O cDNA sintetizado foi utilizado como molde em reações de PCR empregando primers para amplificação do gene *rrsA* (291 pb) e *phaR* (191 pb), com diferentes números de ciclos de amplificação. As reações de PCR foram analisadas em gel de agarose 1,5% (m/v) durante 1 h a 70 mV e se mostra na figura 12.

Figura 12. Eletroforese do gene *rrsA* (16S) e o fragmento *phaR* amplificado por PCR a partir do cDNA de *H. seropedicae* SmR1.



As primeiras 8 amostras representam o fragmento *rrsA* de *H. seropedicae* com um tamanho de 291 pb. e as 8 seguintes correspondem ao fragmento *phaR* de 291 pb. 15, 20 e 25 representam o número de ciclos de amplificação feitos na PCR, enquanto os números

de abaixo (0,4 e 1,0) representam os pontos de densidade ótica das culturas de SmR1 na qual foi extraída o RNA e logo após sintetizado o cDNA empregado em todas as reações. O marcador de peso molecular foi Gene Ruler 100 pb DNA Ladder da Thermo Fischer Scientific®.

Observa-se que independentemente da quantidade de ciclos de amplificação não foi possível observar diferenças na intensidade das bandas. Portanto, pela alta abundância do rRNA 16S, esse gene é usualmente aplicado como um controle positivo e normalizador de expressão em bactérias (JANDA; ABBOTT, 2007; SRINIVASAN et al., 2015). A banda inespecífica no controle negativo a qual apresentou um tamanho menor a 100 pb poderia ser o produto inespecífico dos primers pois não é esperada a amplificação de fragmento pela ausência de DNA na amostra.

Enquanto ao fragmento *phaR*, mesmo tendo algumas dificuldades no gel pela presença de duas bandas. Foram observadas diferenças na intensidade das mesmas a partir da amplificação por PCR da diluição 1/10 do cDNA na condição de 20 ciclos de amplificação entre as amostras avaliadas nas D.O.₆₀₀ 0,4 e 1,0 (lanes 2 e 5, banda de cima correspondente ao tamanho de 291 pb), sendo que a banda é mais intensa no valor D.O.₆₀₀ 1,0.

Tal diferença na intensidade pode ser tomada indiretamente como um indicativo de que há maior quantidade de transcritos do gene *phaR* nessa condição. As condições de 15 e 25 ciclos não foram levadas em conta porque no primeiro caso não é possível observar bandas e no último porque já não é possível observar diferenças entre as duas condições (o mesmo acontece com o controle positivo que foi submetido a 30 ciclos de amplificação).

Para que uma PCR seja adequada em termos semi-quantitativos é indispensável saber em que ponto começa a fase exponencial de replicação do fragmento de interesse. Isso está intimamente ligado ao número de ciclos empregados e a quantidade de sequências alvos no material inicial. A principal meta de todas essas considerações sobre o número de ciclos e diluições de cDNA é justamente identificar o intervalo linear dessa reação no qual, a quantidade de fragmentos amplificados é proporcional à quantidade inicial de alvos presentes, deste modo o intervalo linear (intervalo de proporcionalidade) é aquela parte no ensaio onde a quantificação é acessível e que poderão ser observadas

diferenças entre o padrão de intensidade das bandas nas duas amostras (FERRE, 1992; MARONE et al., 2001).

A RT-PCR semi-quantitativa constitui um método amplamente usado e aceito que pode ser comparado facilmente com outros métodos usados para quantificar níveis de expressão de um gene, existem vários estudos que corroboram a correlação com outras metodologias usadas também como hibridização *in situ* ou análises de Northern Blot (FERRE, 1992).

Portanto, considerando que houve diferença na intensidade das bandas do fragmento de *phaR* nas duas D.O.₆₀₀, sendo maior no ponto 1,0, optou-se por realizar a avaliação do transcriptoma nessa condição. Porém, a avaliação do perfil transcriptômico em D.O. baixa (valores de 0,3-0,4) também pode trazer informações interessantes sobre o efeito repressor do gene *phaR* quando há pouco PHB acumulado na bactéria.

5.3 Análise do transcriptoma diferencial entre *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaR$

A partir das análises computacionais dos dados considerou-se como valores de expressão diferencialmente significativos aqueles que tem um *p-value* $\leq 0,05$ e um valor de \log_2 de *Fold Change* (\log_2FC) maior que 1 e menor que -1. Os resultados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na estirpe mutante $\Delta phaR$

ID NOVO	ID ANTIGO	NOME	DESCRIÇÃO	LOG ₂ FC
HSERO_RS00860	Hsero_0172	<i>araC</i>	Proteína reguladora da família AraC	-1,25*°Δ
HSERO_RS01150	Hsero_0233	=	Transportador MFS (Major Facilitator Superfamily)	-1,4*°Δ
HSERO_RS08150	Hsero_1639	<i>phaP1</i>	Proteína associada com a formação do granulo de PHB	1,38 *Δ
HSERO_RS23810	Hsero_4759	<i>phaP2</i>	Proteína fasina	5,51 *Δ
HSERO_RS09100	Hsero_1824	<i>ibpA</i>	Proteína da família Hsp20	1,10*Δ
HSERO_RS09465	Hsero_1896	<i>acoD</i>	Acetaldeído dehidrogenase dependente de NAD ⁺	-2,60*°Δ
HSERO_RS09470	Hsero_1897		Função desconhecida	-1,64*°Δ
HSERO_RS09750	Hsero_1954		Possível aminotranferase tipo I e II	1,92*°Δ
HSERO_RS09755	Hsero_1955		Proteína hipotética, função desconhecida	2,20*°Δ
HSERO_RS09760	Hsero_1956		Proteína hipotética, homologia com MFS	2,72*°
HSERO_RS10045	Hsero_2010	<i>galE</i>	UDP-glucose epimerase	1,04°Δ
HSERO_RS12565	Hsero_2514	<i>mqsR</i>	Regulador da motilidade quorum sensing	-1,84*°Δ

HSERO_RS13435	Hsero_2678	<i>fabD</i>	Malonil-CoA Transacetilase	1,63* ^o Δ
HSERO_RS13440	Hsero_2679	<i>mdcB</i>	Trifosforibosil- defosfo-CoA sintase	1,46* ^o Δ
HSERO_RS13445	Hsero_2680	<i>mdcG</i>	Fosforibosil-defosfo- CoA Transferase	1,61* ^Δ
HSERO_RS13450	Hsero_2681	<i>mdcC</i>	Malonato descarboxilase subunidade gama	1,20* ^o Δ
HSERO_RS13455	Hsero_2682	<i>accD</i>	Malonato descarboxilase subunidade beta	1,26* ^o Δ
HSERO_RS13465	Hsero_2683	<i>mcdA</i>	Malonato descarboxilase subunidade alfa	1,14*
HSERO_RS13470	Hsero_2684	<i>dctM</i>	Transportador ABC	1,13* ^o Δ
HSERO_RS13475	Hsero_2685	<i>dctQ</i>	Proteína Transportadora dependente de ATP	1,12* ^o Δ
HSERO_RS16430	Hsero_3283		Possível lipofosfolipase da família das esterases	1,29* ^o Δ
HSERO_RS16980	Hsero_3389		Possível Transportador ABC de nitrato	-1,40* ^o Δ
HSERO_RS16985	Hsero_3390		Possível Transportador ABC de nitrato	-1,71* ^o Δ
HSERO_RS17675	Hsero_3541		Alfa-beta hidrolase	-1,06 ^o Δ
HSERO_RS18155	Hsero_3638	<i>narK</i>	Transportador de Nitrato ABC	-3,04* ^o Δ
HSERO_RS18160	Hsero_3639	<i>narU</i>	Transportador de Nitrato ABC	-1,43* ^o Δ

HSERO_RS19965	Hsero_3995		Proteína hipotética	-1,40* ^o ^Δ
HSERO_RS19970-19980	Hsero_3996-3998	<i>livF/LivM</i>	Transportador ABC de aa ramificados	-1,23* ^o ^Δ
HSERO_RS20570	Hsero_4117		Proteína hipotética	-1,11* ^Δ
HSERO_RS20770	Hsero_4157	<i>coxC</i>	Citocromo C oxidase subunidade C	-1,64* ^o ^Δ
HSERO_RS20785	Hsero_4160	<i>coxA</i>	Citocromo C oxidase polipeptídeo I	-1,24* ^o ^Δ
HSERO_RS20790	Hsero_4161	<i>coxB</i>	Citocromo B559 subunidade alfa	-1,92* ^o ^Δ
HSERO_RS22915	Hsero_4585	<i>poxR</i>	Regulador transcricional	-1,17* ^o
HSERO_RS23975	Hsero_4792		Possível transportador de aminoácidos ramificados	-1,15 ^o
HSERO_RS23980	Hsero_4793		Possível transportador de aminoácidos ramificados	-1,11 ^o ^Δ
HSERO_RS23985	Hsero_4794		Função desconhecida	-1,31* ^o ^Δ

Na tabela são apresentados os genes com valor de expressão Log₂FC e *p-value* significativo ($\leq 0,05$) após terem sido avaliados com diferentes combinações de ferramentas (mapeador e pacote de análise de expressão diferencial de genes). Para indicar o tipo de análise com os quais se obteve o mesmo resultado foram colocados símbolos na parte superior esquerda do valor de expressão: *(CLC-EdgeR), °(SHRiMP2-DESeq1) ^Δ(CLC-DESeq2). Esse valor representa a média obtida a partir das três avaliações.

Cabe destacar que houve diferenças significativas na quantidade de genes que foram detectados como diferencialmente expressos e com valor de *p* significativo, sendo que as avaliações com o pacote EdgeR geraram um maior número de genes diferencialmente expressos. Os genes que apareceram diferencialmente expressos em

todas as análises, mesmo com variações no valor do Log₂FC, sempre tiveram a mesma tendência independente do programa utilizado para quantificar a diferença de expressão.

As análises foram feitas empregando combinações de mapeadores e pacotes de análise de expressão gênica diferencial justamente para confirmar que aqueles genes que apareceram como diferencialmente expressos fossem confirmados pelo menos por duas metodologias diferentes.

A decisão foi feita na base do número de *reads* únicos mapeado no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* a partir das bibliotecas geradas após o sequenciamento tal como se mostra na tabela 5. Esse número de *reads* foi relativamente baixo e somente duas bibliotecas conseguiram mapear mais de dois milhões de *reads* únicos. A tabela também mostra como a porcentagem de RNA ribossomal foi relativamente alta em 5 das 6 triplicatas biológicas, com mais de 50% das sequências mapeando com RNA ribossomal. Isto indica que a depleção de rRNA não foi efetiva, por tanto foram feitos novos sequenciamentos para algumas das amostras visando melhorar a quantidade de *reads* mapeados nas ORFs.

Tabela 5. Análise das bibliotecas de RNA seq

Amostra	Biblioteca	Reads Totais	Após poda	Reads sem rRNA	% de ribossomal	Minimum Length-Similarity 0.9-0.8	
						Uniquely mapped	% Uniquely mapped
<i>ΔphaR</i> (1)	R1	8.192.649	7.799.366	2.140.721	72.55	895.606	41.84
<i>ΔphaR</i> (2)	R2	4.370.882	4.186.153	1.080.986	74.18	246.326	22.79
<i>ΔphaR</i> (3)	R3	789.090	761.580	3.395.723	20.63	2.451.344	72.19
	R3_run130	3.603.091	3.516.796				
SmR1(1)	S1	3.540.827	3.401.331	1.276.730	74.96	200.044	15.67
	S1(001)	1.557.728	1.453.937				
SmR1(2)	S2	976.621	937.737	987.725	74.53	185.426	18.77
	S2_run130	2.901.045	2.799.954				
SmR1(3)	S3	3.907.225	3.813.275	11.761.097	69.06	4.984.203	42.38
	S3(003)	34.105.767	29.016.453				

Ainda hoje continua sendo objeto de estudo a determinação de qual é o nível ótimo de cobertura que deve ter um sequenciamento para poder analisar de maneira confiável análises de expressão gênica diferencial. Porém, a maioria dos trabalhos publicados

confirma que quanto maior é a cobertura de um sequenciamento maior será o número de transcritos detectados como diferencialmente expressos e com significância estatística (MCGETTIGAN, 2013; WOLF, 2013).

Em estudos feitos com o transcriptoma de *Escherichia coli* K-12 na fase exponencial se mostrou que um sequenciamento com 2 a 5 milhões de *reads* é suficiente para encontrar diferenças estatísticas marcantes entre genes diferencialmente expressos, porém os autores conseguiram mapear até 156 milhões de *reads* a partir de cDNA depletado e sequenciado empregando o Illumina Miseq (HAAS et al., 2012). Fazer análises com um número de *reads* baixo pode levar à perda daquelas ORFs com poucos *reads*, porém aqueles genes que estejam sendo ativamente sobre expressos ou reprimidos podem ser facilmente detectados mesmo com um baixo número de *reads* (CONESA et al., 2016).

Nas seções a seguir discute-se o provável envolvimento dos genes diferencialmente expressos no mutante Δ *phaR* para o metabolismo de PHB.

5.3.1 Reguladores transcricionais:

5.3.1.1 Reguladores da família AraC.

O gene Hsero_0172 codifica para o regulador transcricional AraC. Esta família de reguladores transcricionais atua diretamente na regulação dos genes implicados no metabolismo de arabinose, que em determinados organismos como *E. coli* encontram-se formando um operon. Além disso podem influenciar também em outras vias metabólicas controlando a degradação de açúcares como celobiose, melobiose, ramnose, aminoácidos como arginina, valina, ornitina e álcoois. As proteínas pertencentes a essa família têm pelo menos três funções regulatórias importantes: metabolismo do carbono, resposta ao estresse e patogenicidade (GALLEGOS et al., 1997).

5.3.2 Síntese e armazenamento de PHB

5.3.2.1 Fasinas

Os genes que expressam as fasinas *phaP1* HSERO_RS08150 (OLD ID: Hsero_1639) e *phaP2* HSERO_RS23810 (OLD ID: Hsero_4759), foram encontrados com expressão aumentada no mutante Δ *phaR*, indicando que PhaR trata-se de um

repressor da síntese de fasinas. Portanto, mesmo em condições nas quais há pouca ou nenhuma produção de PHB os genes *phaP* continuam sendo transcritos no mutante Δ *phaR*. Esse dado corrobora trabalhos anteriores (ALVES et al., 2016; KADOWAKI et al., 2011) nos quais se determinou que a expressão de *phaR* em *H. seropedicae* inibe a produção de ambas as fasinas.

Observa-se também que existe diferença na capacidade de repressão de *phaR* sendo que o gene *phaP2* aparece muito mais expresso do que *phaP1* quando comparado o valor de Log₂FC. Mesmo que no mutante Δ *phaR* a expressão das fasinas não é reprimida, a produção de PHB encontra-se comprometida. A alta expressão das fasinas pode ser um fator que afeta o acúmulo de PHB, como sugerido anteriormente (Potter et al., 2002), porém não se descarta que PhaR também reprima outros genes que são igualmente importantes para a síntese de PHB.

Somente a presença das fasinas não é suficiente para promover o acúmulo de PHB. Entretanto, a análise transcriptômica não apontou diferença na expressão de outros genes implicados no metabolismo central do PHB (*phaA*, *phaB* e *phaC1*).

Adicionalmente, baseado nos resultados obtidos por Kadowaki e colaboradores (2011) sobre a caracterização funcional da proteína PhaR e a sua ligação a determinadas sequencias promotoras, foram avaliados os genes localizados na vizinhança das regiões promotoras previamente descritas. A análise revelou que a maioria dos genes se encontrava numa condição reprimida, log₂FC (nenhum chegou a ser menor ou igual a -1): *ntpA*, *fadB*, *phaZ*, *phbC*, *dksA*, *phaB*. Porém, como o Log₂FC não foi significativo e *p value* foi maior do que o limite de rejeição em todos os casos, os resultados foram descartados e os genes não serão considerados nesse trabalho.

O polihidroxibutirato é um tipo de reserva energética e de equivalentes redutores para a célula em condições de excesso de fonte de carbono, mas na ausência de outros compostos essenciais. Durante a sua biossíntese se formam os grânulos nos quais se associam diferentes proteínas tanto da síntese quanto proteínas associadas ao grânulo como as fasinas, as quais tem grande importância para a manutenção e estabilidade do mesmo. As principais fasinas de *H. seropedicae* são PhaP1 (Hsero_1639) e PhaP2 (Hsero_4759) e a expressão das mesmas depende da produção de PHB já que isso faz

com que o repressor PhaR seja desligado da região promotora desses dois genes. Essa relação foi comprovada através de ensaios da atividade β -galactosidase com o promotor das fasinas em ausência de produção de PHB por mutação do gene *phaC* em *H. seropedicae* (ALVES et al., 2016; TIRAPELLE et al., 2013).

5.3.3 Síntese e degradação de açúcares

5.3.3.1 Acetaldeído desidrogenase dependente de NAD^+

Hsero_1896 é o gene que codifica para essa enzima em *Herbaspirillum seropedicae*, ele aparece como reprimido no mutante $\Delta phaR$ a enzima é responsável pela transformação de acetaldeído em ácido acético. Esse processo gera equivalentes redutores na forma de NADH e também o ácido acético que pode ser transformado em acetil-CoA pela atividade da Acetil-CoA sintetase (Hsero_0019). Podemos inferir então que ao se limitar a transformação de acetaldeído estaria se limitando a produção de PHB através da diminuição de acetil-CoA que é o primeiro intermediário na via de síntese. No caso do organismo modelo *Ralstonia eutropha* se sintetiza PHB (poli-3-hidroxibutirato) a partir de acetil-CoA via R(-)-3-hidroxibutiril-CoA, empregando uma via de três passos, que depende de uma β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH e a PHB sintase. Acetil-CoA é então o intermediário central do metabolismo de PHB de qualquer microrganismo e ele pode ser formado a partir de fontes de carbono como carboidratos e ácidos graxos (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

A diminuição da expressão desse gene pode comprometer também a disponibilidade de equivalentes redutores na forma de NADH os quais podem ser empregados na cadeia respiratória ou na síntese de PHB. Porém, também poderia ser que a repressão seja uma resposta justamente ao estresse oxidativo, já que como será definido mais adiante, os genes implicados na síntese das diferentes subunidades da citocromo C oxidase também aparecem como reprimidos.

5.3.3.2 UDP-glucose epimerase

O gene que codifica para a enzima UDP-glucose-4' epimerase *galE* (Hsero_2010) aparece com expressão aumentada no transcriptoma do mutante $\Delta phaR$. Segundo a literatura, ele tem diferentes funções nas bactérias, entre elas: é responsável pela

epimerização reversível da UDP-glucose a UDP- galactose, sendo então um componente essencial na via de Leloir para o metabolismo da galactose (GROSSIORD et al., 1998).

UDP glucose-4' epimerase provê também UDP galactose, composto necessário para a síntese de polissacarídeos com galactose, incluindo polissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPS) e polissacarídeos extracelulares (EPS). Esse gene é essencial para algumas cepas de bactérias que sintetizam fatores de virulência. Por exemplo, num estudo feito com o mutante *galE* da bactéria *Brucellas abortus*, patógeno de animais e humanos, percebeu-se que a mutação não gerou mudanças na morfologia da colônia e, portanto, não houve uma alteração da composição de LPS/EPS. Porém, os autores não descartaram a possibilidade de existir outra cópia do gene na bactéria ou alguma outra via metabólica que levasse também à formação de UDP-galactose (SCUPHAM; TRIPLETT, 1997). O resultado também poderia indicar uma possível explicação sobre as diferenças encontradas no crescimento das duas estirpes, sendo que o mutante Δ *phaR* apresentou um tempo de geração mais curto quando crescido em galactose.

A ativação do gene *galE* e a relação entre o seu produto e a síntese de lipopolisacarídeos e polissacarídeos extracelulares nos leva a especular que as possíveis diferenças observadas nas culturas líquidas entre a estirpe parental SmR1 e Δ *phaR* possam ser em parte devido à alterações das vias metabólicas de ES/LPS, já que em alguns casos as culturas líquidas do mutante Δ *phaR* mostraram sempre uma susceptibilidade maior a se agregar em comparação à estirpe parental SmR1 (resultados não mostrados). Porém para os efeitos das análises feitas sempre se teve cuidado de não favorecer condições que levassem a um estado de agregação nos pré-inóculos nem nas avaliações feitas sobre o crescimento e produção de PHB.

5.3.4 Biossíntese de ácidos graxos

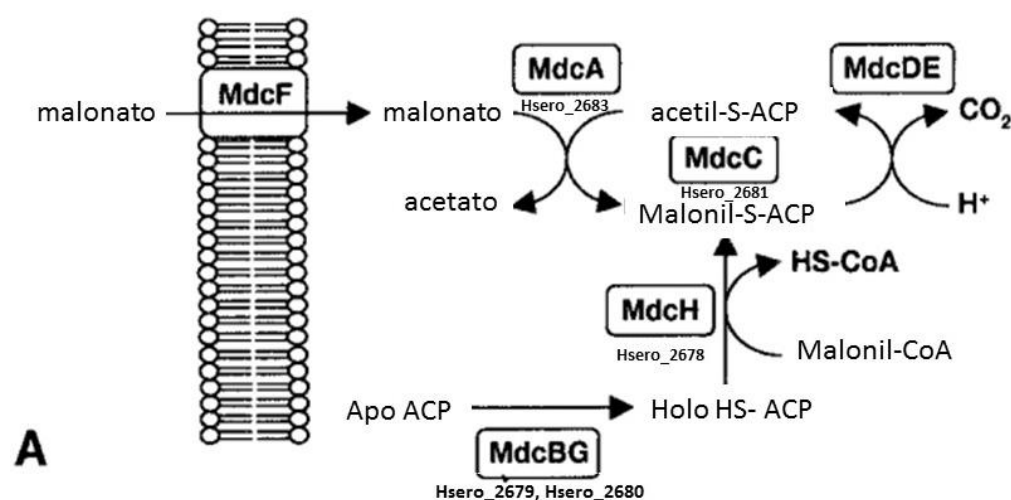
5.3.4.1 Complexo Malonato descarboxilase

Os genes que expressam proteínas do complexo multienzimático da malonato descarboxilase tiveram seus níveis de transcritos aumentados no mutante Δ *phaR*. O primeiro (Hsero_2678) codifica para a proteína Malonil-CoA transacetilase um componente essencial na descarboxilação cíclica do malonato. A enzima malonato descarboxilase é encarregada da descarboxilação de malonato a acetato e CO₂. O estudo dessa enzima em numerosas bactérias como *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Malonomomas rubra*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas*

fluorescens sugere que todas as malonato descarboxilases possuem uma proteína carreadora de grupos acila (ACP) que contém 2'-(5"-fosforibosil)-3-defosfo-CoA como grupo prostético (CHOHNAN; AKAGI; TAKAMURA, 2003).

O esquema completo da descarboxilação do malonato e cada uma das etapas é explicado brevemente na Figura 13.

Figura 13. Mecanismo de reação da malonato descarboxilase em *Klebsiella pneumoniae*



A figura mostra cada uma das etapas envolvidas na descarboxilação do malonato (incluindo a assimilação). Porém, deu-se ênfase somente naqueles genes presentes na análise transcriptômica do mutante $\Delta phaR$. Fonte: (HOENKE; WILD; DIMROTH, 2000), modificado.

A Malonil-CoA transacetilase “MCAT” (Hsero_2678) é a subunidade da enzima encarregada da transferência do grupo malonil à proteínas transportadoras de grupos acilos (ACP) dentro do complexo enzimático formando intermediários de malonil-ACP que constituem uma das etapas iniciais na síntese de ácidos graxos (CHOHNAN; AKAGI; TAKAMURA, 2003; ZHANG et al., 2007).

Os genes Hsero_2679 e Hsero_2680 codificam para as proteínas trifosforibosil-defosfo-CoA sintetase e fosforibosil-defosfo-CoA transferase, respectivamente. A primeira produz trifosforibosil defosfo-CoA que se converte no grupo prostético da subunidade de proteína carreadora de grupos acila no complexo multienzimático da malonato descarboxilase, a segunda é encarregada da transferência de 2'-(5-

trifosfribosil)-3' defosfo coenzima-A à proteína Apo (proteína carreadora de acila) do complexo da malonato descarboxilase para produzir holo-[proteína carreadora de acila] e difosfato.

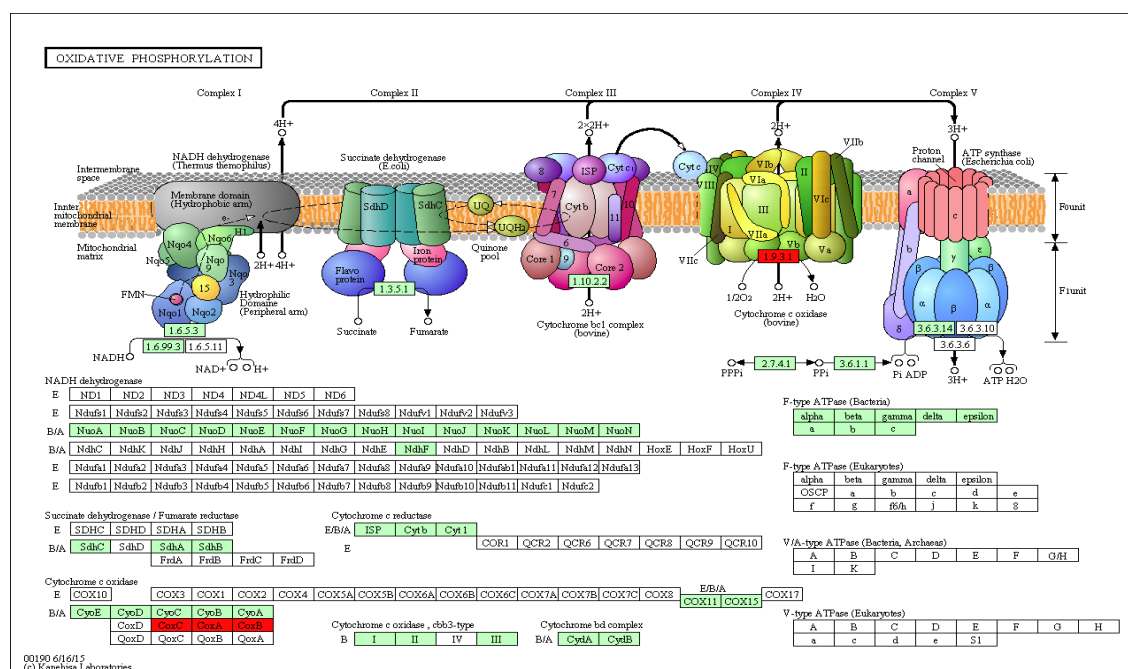
Os genes Hsero_2681, Hsero_2682 e Hsero_2683 codificam respetivamente as subunidades gama, beta e alfa da malonato descarboxilase que são os encarregados do processo de descarboxilação (não mostradas completamente na figura).

A β -oxidação é a principal via quando ácidos graxos são usados como fonte de carbono para a produção de PHB, e a biossíntese de ácidos graxos de novo é a principal via durante o crescimento em substratos que são metabolizados a acetil-CoA como gluconato, acetato, etanol e também o malato. No mutante PHB⁻4 de *Ralstonia eutropha* esses genes aparecem também como sobre expressos e por tanto também confirmam que poderia ser um link que permitiria desviar a síntese de PHB à via de síntese de ácidos graxos (PEPLINSKI et al., 2010).

Também em um estudo de proteoma feito com o mutante PHB-4 da bactéria *Ralstonia eutropha* encontrou-se entre as proteínas com uma expressão aumentada várias AcilCoA transferases. De forma geral elas catalisam reações de transferência reversível de grupos coenzima A de tioester de CoA a ácidos livres (RABERG et al., 2014).

Sendo assim podemos especular que o mutante $\Delta phaR$ encontra-se redirecionando o fluxo de Acetil-coA na via de síntese de novo de ácidos graxos, esses resultados contrastam com o que tinha sido observado no mutante $\Delta phaC1$ de *Herbaspirillum seropedicae*, que apresentou esse mesmo cluster de genes reprimidos (SILVANO, 2015). Porém, é importante destacar que o mutante $\Delta phaC1$ de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 tem a proteína PhaR sempre ligada no DNA, isso pela ausência na produção de PHB devido à ausência da PHB sintase, enquanto o nosso mutante pela ausência do gene é incapaz de produzir a proteína, essa consideração deve ser levada em conta para o resto das análises feitas comparando ambos transcriptomas.

A análise proteômica do mutante $\Delta phaC$ em *Ralstonia eutropha* mostrou que a limitação da síntese de PHB no mutante levou a aumentos na transcrição de proteínas como citrato liase e acetoina desidrogenase. A via de síntese de acetoina é essencial para



A figura apresenta os quatro complexos que fazem parte do sistema de fosforilação oxidativa. Os genes em verde são aqueles encontrados em *H. seropedicae*, os marcados em vermelho representam os três genes que aparecem menos expressos no mutante $\Delta phaR$, os quais fazem parte do complexo 4 da cadeia respiratória encarregado da passagem dos elétrons ao oxigênio. Fonte: KEGG-Metabolic Pathways (OKUDA et al., 2008).

A Citocromo C oxidase é um dos complexos da cadeia respiratória e constitui uma das maiores proteínas de membrana. Esta oxidase tem um centro bi-metálico heme-cobre como intermediário carreador de elétrons. As citocromos oxidases tem um sitio adicional de cobre como um aceptor imediato de elétrons, que está presente na membrana externa de bactérias. O complexo é capaz também de transferir prótons ao espaço periplasmático que são empregados na síntese de ATP pela criação de um potencial eletroquímico entre o espaço periplasmático e o citosol (SCOTT, 1995).

Os complexos respiratórios em bactérias costumam ser mais complexos que em organismos eucarióticos e isso tem a ver diretamente com: 1) os processos de respiração e transdução de energia acontecem diretamente na membrana citoplasmática e não há portanto uma separação espacial, 2) a capacidade e necessidade de se adaptar a condições ambientais que podem mudar facilmente, por isso as bactérias possuem uma alta diversificação das vias metabólicas empregadas (LUDWIG, 1987).

H. seropedicae SmR1 possui uma cadeia respiratória ramificada que compreende quatro tipos diferentes de oxidases terminais, entre essas as citocromo oxidases tipo aa₃ (constituídas pelos genes *coxABC*), as quais são muito similares as citocromo oxidases eucarióticas. Bactérias são capazes de regular a transcrição dos genes da citocromo oxidase por meio de vários reguladores transcricionais (UNDEN; BONGAERTS, 1997). Porém, em *H. seropedicae* a regulação desses genes não é totalmente conhecida. Sabe-se que o operon *coxAB* (Hsero_4160 e Hsero_4161) e os genes associados *coxC* (Hsero_4157), *coxG* (Hsero_4159) não são regulados pela proteína Fnr (BATISTA et al., 2013).

Ainda não se pode definir se a diminuição da transcrição de genes da citocromo C oxidase seja um efeito direto da deleção de *phaR* ou se pelo contrário trata-se de uma

resposta diante do acúmulo de equivalente redutores e intermediários metabólicos como acetil-CoA, que não estão sendo direcionados para a síntese de PHB. Essa situação de desequilíbrio metabólico na célula poderia inibir algum regulador transcricional envolvido na expressão da citocromo C oxidase.

5.3.6 Transportadores e genes relacionados ao estresse

5.3.6.1 Sistema de transporte de dicarboxilato-C4 de tipo TRAP

HSERO_RS13470 (Hsero_2684) e HSERO_RS13475 (Hsero_2685) correspondem aos genes *dctM* e *dctQ* que encontram-se formando um pequeno operon que expressa um transportador de dicarboxilato da família TRAP (transportadores periplasmáticos independentes de ATP). A transcrição desses genes está aumentada no mutante $\Delta phaR$.

Esse tipo de sistema está presente também na bactéria *Rhodobacter capsulatus*, uma bactéria modelo para o estudo da fotossíntese, fixação de nitrogênio e regulação de genes em resposta ao ambiente. Essa bactéria é capaz de utilizar dicarboxilatos C4 como malato e succinato. O crescimento aeróbico nesses substratos é mediado por um sistema transportador dependente de ligante protéico e sensível a choque osmótico codificado pelo locus *dct*. Ele compreende três genes essenciais, um deles tem uma função estrutural (*dctP*) e os outros dois são regulatórios (*dctS* e *dctR*). Adicionalmente foram encontrados em *R. capsulatus* os outros dois genes (*dctQ* e *dctM*) essenciais para o transporte de dicarboxilato C4. Ambos constituem proteínas de membrana que se diferencia dos sistemas ABC (ATP Binding Cassette) pelo fato de não precisar de ATP para realizar o transporte; eles empregam um gradiente eletroquímico de íons para levar a cabo tal função (FORWARD et al., 1997; KELLY; THOMAS, 2001). Ao contrário da nossa análise, a avaliação transcriptômica do mutante $\Delta phaC1$ de *Herbaspirillum seropedicae* encontrou que os genes que fazem parte desse sistema foram encontrados reprimidos, (SILVANO, 2015). Podemos dizer então que a proteína PhaR tem um efeito regulador dos genes que fazem parte desse sistema de transporte reprimindo a sua transcrição em condições de não acúmulo de PHB.

5.3.7 Nitrato Redutase Respiratória (NAR)

Os genes *narK* (Hsero_3638) e *narU* (Hsero_3639) encontraram-se reprimidos no mutante $\Delta phaR$. As proteínas NarK e NarU fazem parte de um sistema de transporte de nitrato da MFS (*Major Facilitator Superfamily*) presente em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 que é ativado em condições de ausência de amônio, permitindo assim as bactérias assimilarem fontes nitrogenadas como nitratos e nitritos (BALSANELLI et al., 2016). A presença desse sistema NAR (Nitrato Redutase Assimilatória) não está relacionada com a respiração de nitrato, pois já foi demonstrado que o *H. seropedicae* SmR1 não é capaz de crescer em anaerobiose e na presença de nitrato (BALDANI et al., 2016). A ativação de *narK* que faz parte do cluster *narKIUGHJJmoaA* é feita pela proteína Fnr em condições de baixo oxigênio. Na avaliação do mutante *narG* de *H. seropedicae* SmR1 (BONATO et al., 2016), esse sistema não foi requerido para a assimilação de nitrato, mas sim para outros processos metabólicos como a produção de altos níveis de nitrito, a produção de óxido nítrico e a dissipação do poder redox o que provoca um aumento no consumo de carbono nas células.

Outro trabalho também em *Herbaspirillum seropedicae* (BATISTA et al., 2013), analisou o operon avaliando fusões transcricionais com o gene *lacZ* acopladas ao promotor *narKI* em células crescendo em meio com nitrato e amônio em condições de baixo oxigênio. Os autores mostraram que somente na presença de nitrato/baixo oxigênio podia ser ativada a transcrição do promotor *narKI*. Porém, na análise transcriptômica do mutante $\Delta phaR$ não está claro como a repressão desses dois genes pode ser o resultado do desbalanço metabólico que sofre o mutante e como isso influencia na produção de PHB.

Entender como as bactérias podem empregar o nitrato é sumamente importante para entender as diferentes velocidades de degradação desse composto no ambiente, especialmente porque o nitrato pode ter diferentes funções celulares dependendo de como ele esteja sendo metabolizado. Isso faz com que ele seja um composto essencial no ciclo do nitrogênio, as bactérias podem utilizar o nitrato como uma fonte de nitrogênio, como aceptor final de elétrons, ou como dissipador de equivalentes redutores (BATISTA, 2011; BONATO et al., 2016).

5.3.8 Transportadores ABC

Vários genes que codificam transportadores do tipo ABC tiveram menor transcrição no mutante $\Delta phaR$, seus produtos são: HSERO_RS16980 (Hsero_3389) codifica para uma proteína de ligação ao substrato que faz parte de um transportador ABC de nitrato/sulfonato e bicarbonato, e HSERO_RS16985 (Hsero_3390) proteína do componente periplasmático do mesmo transportador. Eles fazem parte de um sistema de nitrato ABC.

Os transportadores ABC (ATP binding cassette) catalisam a translocação de vários substratos entre membranas bacterianas, eles permitem a captação de nutrientes e moléculas importantes do meio externo (importadores) ou facilitam o efluxo de toxinas (exportadores).

Também foram encontrados vários clusters de genes que tiveram a transcrição diminuída no mutante $\Delta phaR$: HSERO_RS23975 (Hsero_4792) e HSERO_RS23980 (Hsero_4793); HSERO_RS12815 (Hsero_2563), HSERO_RS12820 (Hsero_2564); HSERO_RS19965 (Hsero_3995), HSERO_RS19970 (Hsero_3996) e HSERO_RS19980 (Hsero_3998), todos eles fazem parte de um sistema de transporte ABC que é encarregado da captação de aminoácidos ramificados “LIV” (Leucina, Isoleucina, Valina) e também tem um papel no quórum sensing bacteriano (HOSIE; POOLE, 2001).

Esses transportadores são parte da família de “transportadores de aminoácidos hidrofóbicos” (HAAT) de transportadores de aminoácidos, sendo que alguns membros foram caracterizados em organismos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOCHER, 2009). Em *E. coli* o transportador de alta afinidade de aminoácidos ramificados (LIV-1) consiste de pelo menos seis genes com duas proteínas extracelulares que ligam solutos (LivJ, LivK) duas proteínas integrais de membrana (LivH e LivM) e duas proteínas de ligação ao ATP (LivG e LivF). Os genes encontram-se pelo menos em dois operons. Esse sistema se encontra reprimido em *E. coli* quando a bactéria é crescida na presença de leucina, sendo que a regulação é dependente do regulador global Lrp (HOSIE; POOLE, 2001).

5.3.9 Proteínas de proteção contra o choque oxidativo e térmico

O gene HSERO_RS09100 (Hsero_1824) que codifica uma proteína chaperona denominada IbpA foi encontrado com transcrição aumentada no mutante $\Delta phaR$. Esse

gene que tem um homólogo em *E. coli* faz parte de um sistema de duas proteínas IbpA-IbpB que atuam como protetores de choque térmico e estresse ao etanol e superóxido. A superexpressão dessas proteínas levou a maior proteção ao peróxido de hidrogênio e superóxido de potássio, enquanto a deleção desses genes levou a um aumento da susceptibilidade a esses agentes oxidativos (KITAGAWA et al., 2002; MATUSZEWSKA et al., 2008).

5.3.10 Quorum sensing

O regulador da motilidade e quorum sensing representado pelo gene *mqsR* HSERO_RS12565 (Hsero_2514) encontrou-se reprimido no mutante Δ *phaR*. Até o momento, a função do regulador MqsR não foi estudada em *H. seropedicae*. Em *E. coli*, a expressão de *mqsR* é positivamente regulada pelo sinal de quorum sensing AI-2. Isso desencadeia a ativação do sistema de dois componentes *qseB-qseC*. Esse operon tem um papel importante na formação de biofilmes.

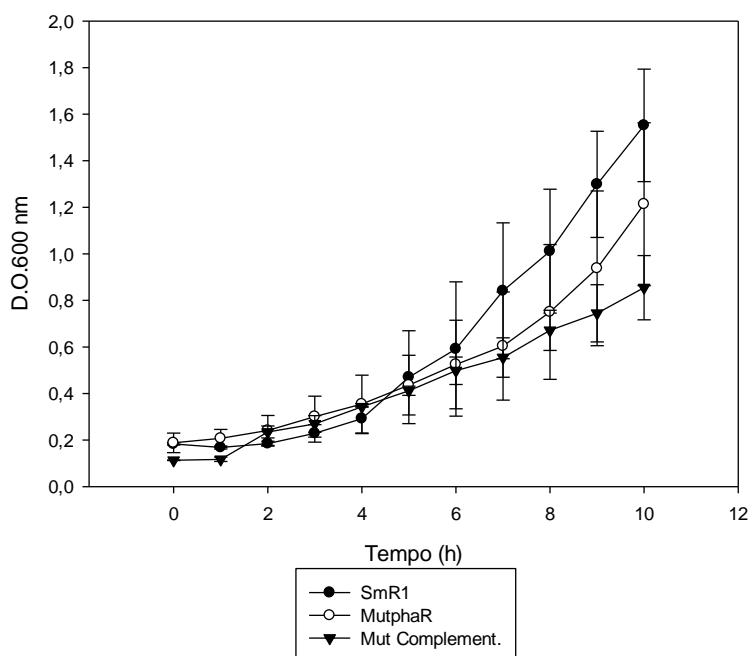
MqsR é um tipo de toxina co-expressa junto com a antitoxina YgiT. Constituindo um sistema toxina-antitoxina ele é um novo tipo de interferase de mRNA capaz de clivar RNAs na sequência GCU, ao mesmo tempo conduz ao enriquecimento de mRNAs que codificam para proteínas relacionadas ao estresse CstA, CspD, RpoS, Dps e HokD (WANG et al., 2013; YAMAGUCHI; PARK; INOUE, 2009).

5.4 Reavaliação do crescimento celular e produção de PHB em estirpes complementadas com o plasmídeo pMJP01

Com a finalidade de avaliar como a complementação do mutante Δ *phaR* de *H. seropedicae* com a cópia do gene *phaR* poderia restabelecer o crescimento e a produção de PHB a níveis similares obtidos na estirpe selvagem foram realizados ensaios de crescimento e produção empregando novamente as estirpes SmR1, Δ *phaR* e cepa C (Δ *phaR* complementado com pMJP01) cultivadas em meio NFb – HPN com galactose para avaliação do crescimento e NFb Malato-HPN para a avaliação da produção de PHB, tanto por citometria de fluxo quanto pela cromatografia gasosa.

Os ensaios de crescimento foram preparados como descrito na metodologia em triplicata biológica e as avaliações do crescimento foram feitas de hora em hora medindo a densidade óptica a 600 nm. A curva de crescimento está na Figura 15.

Figura 15. Curva de crescimento em meio NFb-HPN com galactose das estirpes SmR1, $\Delta phaR$ e $\Delta phaR$ complementado com pMJP01.



No gráfico é possível observar que houve diferenças no crescimento das estirpes, sendo que a estirpe complementada apresentou um crescimento menor que a estirpe selvagem e o mutante $\Delta phaR$ o resultado é confirmado quando calculados os tempos de geração das estirpes que se apresenta a continuação na seguinte tabela 6.

Os valores de tempo de geração foram calculados novamente e são mostrados na seguinte tabela 6.

Tabela 6. Tempo de geração das estirpes crescidas em meio NFb-HPN com galactose

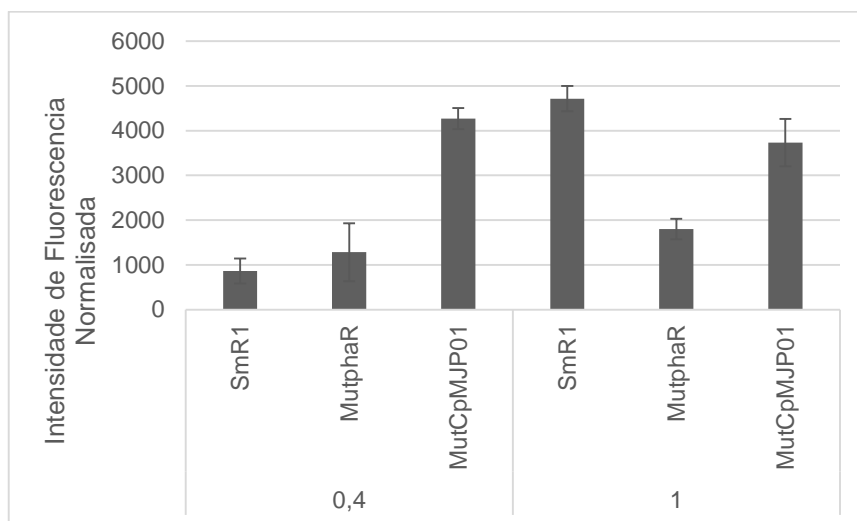
<i>Estirpe</i>	<i>Tempo de Geração \pm Desvio Padrão</i>
<i>SmR1</i>	$2,82 \pm 0,43$
<i>$\Delta phaR$</i>	$3,30 \pm 0,27$
<i>$\Delta phaR \alpha pMJP01$</i>	$4,6 \pm 0,72$

As análises estatísticas mostraram diferenças significativas entre a estirpe complementada, o mutante $\Delta phaR$ e estirpe parental SmR1 (ANOVA, $p \text{ value} < 0,05$). Ao contrário do que tinha sido mostrado previamente o mutante $\Delta phaR$ apresentou um

tempo de geração maior inclusive que a estirpe parental SmR1, a estirpe complementada teve o tempo de geração mais longo. Tais comportamentos nos levam à conclusão de que as estirpes empregadas como preinóculos para a realização da curva poderiam se encontrar em um estado metabólico alterado, também as diferenças no crescimento da estirpe complementada poderiam se derivar de um efeito do uso dos dois antibióticos para assegurar a seleção da cepa com o plasmídeo que contém o fragmento do gene *phaR*.

Precisa-se então repetir novamente esses experimentos pois há diferenças sim, no padrão de crescimento entre as três estirpes, somente não está ficando claro se o crescimento em meio galactose resulta melhor no mutante $\Delta phaR$. Porém, já foi comentado na análise transcriptômica que o gene envolvido no metabolismo da galactose *galE* teve a sua expressão aumentada no mutante, por tanto uma das ideias é que tal comportamento tivesse um efeito positivo na degradação e utilização desse açúcar e assim um melhor desempenho no crescimento dessa estirpe. Adicionalmente é recomendável empregar sempre culturas frescas em placa para o ensaio e sempre cuidar que as estirpes usadas como preinoculo não tenham sofrido nenhum tipo de estresse que possa então afetar esse padrão de crescimento.

A produção de PHB foi avaliada novamente por citometria de fluxo empregando as três estirpes crescidas em meio malato, dessa vez foi avaliada em dois pontos diferentes de densidade ótica, D.O.₆₀₀ 0,4 e 1,0 (condição na qual se avaliou o transcriptoma) os resultados são mostrados na figura 16.

Figura 16. Avaliação da produção de PHB por citometria de fluxo

A figura mostra os valores do PHB acumulado segundo a técnica de Citometria de Fluxo como “Intensidade de Fluorescência Normalizada” avaliado em duas densidades óticas (0,4 e 1,0), condições de pouco armazenamento e de acúmulo ativo de PHB respectivamente.

É possível observar como a estirpe mutante $\Delta phaR$ teve dificuldades para produzir PHB da mesma forma que já tinha sido observado previamente, enquanto que o mutante complementado teve uma produção significativamente maior, mostrando assim que o reestabelecimento do gene *phaR* consegue fazer com que se recupere a capacidade de síntese e acúmulo de PHB na bactéria.

Para confirmar esses dados, a produção de PHB também foi medida pela técnica de cromatografia gasosa com as mesmas amostras usadas no ensaio de citometria de fluxo, os resultados são mostrados na Figura 17.

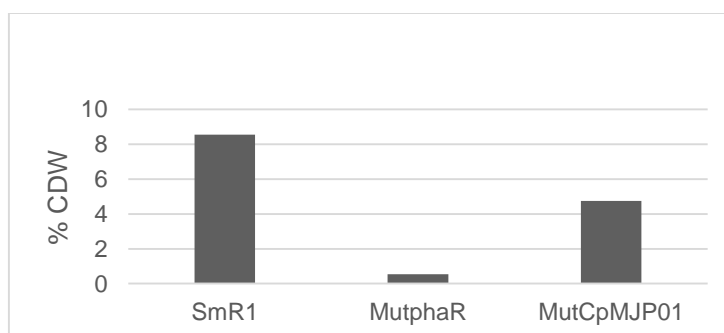
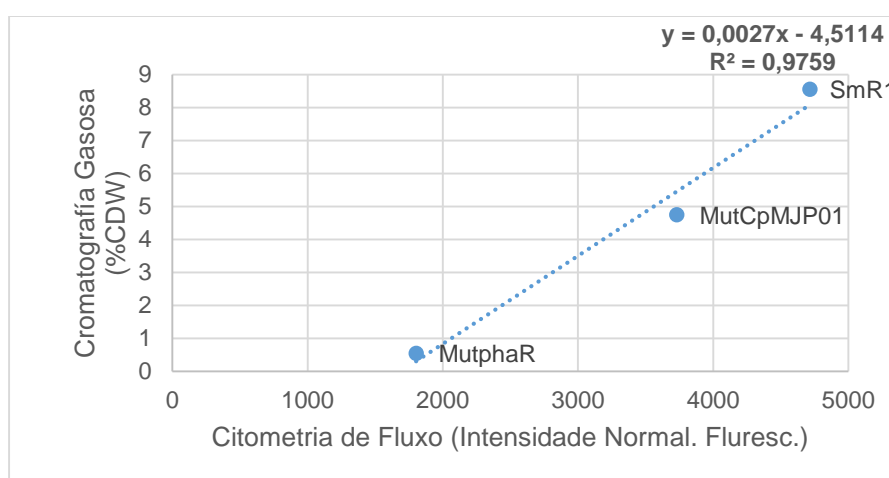
Figura 17. Avaliação da produção de PHB por cromatografia gasosa

Figura apresenta os valores de PHB produzidos nas três estirpes expressos como a porcentagem de peso seco celular (%CDW), todos os valores foram calculados

empregando culturas num valor de D.O.₆₀₀ de 1,0 e por triplicata biológica de cada estirpe

Além disso foi feita uma análise correlação dos dados sobre o acumulo de PHB nas três estirpes empregando as duas técnicas (Cromatografia gasosa e Citometria de Fluxo) e os resultados mostraram uma alta correlação, validando dessa forma o protocolo estabelecido por Alves e colaboradores. Os resultados são mostrados na figura 18.

Figura 18. Análise de correlação das técnicas citometria de fluxo e cromatografia gasosa avaliando a produção de PHB nas estirpes SmR1, mutante $\Delta phaR$ e $\Delta phaR$ complementado de *H. seropedicae*.



A figura mostra a interseção entre os valores obtidos a partir das duas análises (cromatografia gasosa e citometria de fluxo) para cada uma das estirpes avaliadas, a reta indica uma correlação linear nos dados superior ao 97% de acordo com o valor de R^2 na equação da parte superior direita da figura.

Alves e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da deleção dos genes que codificam as fasinas *phaP1* e *phaP2* na produção de PHB em *H. seropedicae*. Esse trabalho mostrou que quando crescida em meio NFb-malato a estirpe parental SmR1 chegou a atingir níveis de produção de até 13% do peso seco (CDW) numa D.O.₆₀₀ 1,2 (início da fase estacionária). O mutante $\Delta phaP1$ apresentou metade do valor de PHB, no nosso caso a estirpe selvagem atingiu 9% de peso seco em PHB numa D.O.₆₀₀ menor (1,0), mas a diferença com o mutante $\Delta phaR$ foi muito grande sendo que este apresentou menos de 1% de peso seco no mesmo valor de D.O.₆₀₀. Sendo assim, foi demonstrado novamente que a complementação do mutante restabelece a síntese de PHB, tendo que a

mesma aumenta em 5% do peso seco, o que representa pouco mais da metade do PHB produzido pela estirpe selvagem.

6. CONCLUSÕES

1. A avaliação do perfil de crescimento em diferentes fontes de carbono mostrou que o mutante $\Delta phaR$ apresenta um perfil de crescimento muito similar à estirpe parental SmR1
2. Os níveis de produção de PHB da estirpe mutante $\Delta phaR$ foram significativamente mais baixos respeito à estirpe parental SmR1 em condições de acúmulo de PHB.
3. A análise transcriptômica mostrou que o mutante $\Delta phaR$ sobre expressa genes implicados na via de síntese de novo de ácidos graxos o que representa um possível mecanismo de desvio de intermediários da síntese de PHB.
4. O mutante $\Delta phaR$ teve uma expressão diminuída de genes implicados na cadeia respiratória, especificamente citocromo c oxidase, isso junto com o aumento na expressão de genes associados ao estresse indicaria uma possível resposta ao desequilíbrio provocado pelo pouco acúmulo de PHB que apresenta essa estirpe.
5. Vários genes implicados no transporte de nitrato e a de aminoácidos ramificados tiveram a sua expressão diminuída no mutante $\Delta phaR$ indicando assim uma outra via de redirecionamento dos intermediários das sínteses de PHB em direção às sínteses de aminoácidos ramificados.
6. A complementação do mutante $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae* com o fragmento do gene *phaR* conseguiu restabelecer parcialmente a produção de PHB aos níveis obtidos na estirpe parental SmR1

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. P. S. et al. Backup expression of the PhaP2 phasin compensates for phaP1 deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, maintaining fitness and PHB accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–13, 2016.

ALVES, L. P. S. et al. A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2017.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. [s.d.].

ANJUM, A. et al. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.

BALDANI, J. I. et al. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. p. 86–93, 2016.

BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233–2244, 2010.

BALSANELLI, E. et al. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BATISTA, M. B. Construção e caracterização de estirpes mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos gene fnr(1), fnr(2) e fnr(3). p. 118, 2011.

BATISTA, M. B. et al. The *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 Fnr orthologs controls the cytochrome composition of the electron transport chain. **Scientific reports**, v. 3, p. 2544, 2013.

BONATO, P. et al. RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory

nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2677–2688, 2016.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2–3, p. 127–161, 1998.

CAI, S. et al. A Novel DNA-binding protein, PhaR, plays a central role in the regulation of Polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 373–385, 2015.

CATALÁN, A. I. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1352–1357, 2007.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Pergamon BIODEGRADABLE POLYMERS. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 97, p. 1273–1335, 1998.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010.

CHAVES, D. F. S. et al. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v. 7, n. 20, p. 3759–3763, 2007.

CHOHNAN, S.; AKAGI, K.; TAKAMURA, Y. Functions of malonate decarboxylase subunits from *Pseudomonas putida*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 214–217, 2003.

CHOU, M. E.; YANG, M. K. Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, n. 2, p. 138–143, 2010.

CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. p. 1–19, 2016.
 FERRE, F. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. **PCR Methods Appl.**, v. 17, p. 1–9, 1992.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.

FORWARD, J. A et al. TRAP Transporters: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the. **Microbiology**, v. 179, n. 17, p. 5482–5493, 1997.

GALLEGOS, M. T. et al. Arac / XylS family of transcriptional regulators . AraC / XylS Family of Transcriptional Regulators. v. 61, n. 4, p. 393–410, 1997.

GARCÍA, B. et al. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29228–41, 8 out. 1999.

GERNGROSS, T. U. et al. Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 16, p. 5289–93, ago. 1993.

GROSSIORD, B. et al. Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. **Le Lait**, v. 78, n. 1, p. 77–84, 1998.

HAAS, B. J. et al. How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes. **BMC Genomics**, v.13, n.734, p. 1471-1484, 2012.

HASIRCI, V. et al. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 135–150, 2001.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 57, n. 1, p. 1–6, jan. 1989.

HOENKE, S.; WILD, M. R.; DIMROTH, P. Biosynthesis of triphosphoribosyl-dephospho-coenzyme A, the precursor of the prosthetic group of malonate decarboxylase. **Biochemistry**, v. 39, n. 43, p. 13223–13232, 2000.

HOSIE, A. H. F.; POOLE, P. S. Bacterial ABC transporters of amino acids. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 259–270, 2001.

JAEGER, K.-E. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, 1994.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JAYASEKARA, R. et al. Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 3, p. 231–251, jul. 2005.

JENDROSSEK, D. Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 317–325, 1998.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3195–3202, 2009.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 5–6, p. 451–463, 1996.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization Involvement of the Reserve Material Poly- γ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244–3250, 2003.

KADOWAKI, M. A. S. et al. Identification and characterization of PhbF: a DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 230, 2011.

KADOWAKI, M. A. S. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS PHBF , PHAP1 e HFQ DE *Herbaspirillum seropedicae*. 2012.

KELLERHALS, M. B. et al. Renewable Long-Chain Fatty Acids for Production of Biodegradable Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at Laboratory and Pilot Plant Scales. **Macromolecules**, v. 33, n. 13, p. 4690–4698, 1 jun. 2000.

KELLY, D. J.; THOMAS, G. H. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea [Review]. **FEMS Microbiol.Rev.**, v. 25, p. 405–424, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KITAGAWA, M. et al. *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 12, p. 2907–2917, 2002.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad host range cloning vector PBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 175–176, 1995.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 26 mar. 2000.

LIEBERGESELL, M.; SCHMIDT, B.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS Microbiology Letters**, v. 99, n. 2–3, 1992.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1514, p. 239–245, 2009.

LUCAS, N. et al. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 429–442, 2008.

LUDWIG, B. Cytochrome c Oxidase in Prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 46, p. 41–56, 1987.

LUENGO, J. M. et al. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251–260, 2003.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MAEHARA, A. et al. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2914–2921, 1999.

MAEHARA, A. et al. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* phaP expression in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, n. 1, p. 9–15, 2001.

MAEHARA, A. et al. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 14, p. 3992–4002, 2002.

MARONE, M. et al. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biological procedures online**, v. 3, n. 1, p. 19–25, 2001.

MATUSZEWSKA, E. et al. Escherichia coli heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1739–1747, 2008.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in Bacillus megaterium. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 585–92, jan. 1999.

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 1, p. 4–11, 2013.

NAGAI, Y. et al. Photodegradation mechanisms in poly(2,6-butylenenaphthalate-co-tetramethyleneglycol) (PBN–PTMG), Part III: Photodegradation induced by the carbonyl group in n, π^* excited states. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 1, p. 134–138, 2008.

OJUMU, T. V; YU, J.; SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 18–24, 2004.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in Azospirillum brasilense and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2–4, 1992.

OKUDA, S. et al. KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W423–W426, 19 maio 2008.

PANKIEVICZ, V. C. S. et al. RNA-seq transcriptional profiling of Herbaspirillum seropedicae colonizing wheat (Triticum aestivum) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 2016.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PEPLINSKI, K. et al. Genome-wide transcriptome analyses of the “Knallgas” bacterium

Ralstonia eutropha H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. n. 2010, p. 2136–2152, 2017.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 552–560, 2005a.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation †. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 552–560, mar. 2005b.

RABERG, M. et al. A closer look on the polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (DAVID W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCOTT, G.; SCOTT, G. Polymers in modern life. In: SCOTT, G. (Ed.). . [s.l: s.n.]. p. 1–18.

SCOTT, R. A. Functional significance of cytochrome c oxidase structure. **Structure (London, England : 1993)**, v. 3, n. 10, p. 981–6, 1995.

SCUPHAM, A. J.; TRIPLETT, E. W. Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, galE, from *Brucella abortus* 2308. **Gene**, v. 202, n. 1–2, p. 53–59, 1997.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SHIMAO, M. Biodegradation of plastics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 242–247, 2001.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, nov. 1983.

SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 3, p. 561–584, 2008.

SRINIVASAN, R. et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117617, 6 fev. 2015.

STEINBÜCHEL, A. et al. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2–4, 1992.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 419–427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; WIECZOREK, R.; KRÜGER, N. PHA biosynthesis, its regulation and application of C1-utilizing microorganisms for polyester production. In: **Microbial Growth on C1 Compounds**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996. p. 237–244.

STUBBE, A.; YORK, G. M.; SINSKEY, A. J. Accumulation of the PhaP Phasin of. v. 183, n. 14, p. 4217–4226, 2001.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.

SUN, J. et al. Involvement of glnB, glnZ, and glnD genes in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 985–988, 2002.

SURIYAMONGKOL, P. et al. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148–175, 2007.

SZNAJDER, A.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1847–1858, 2015.

TAKAKU, H. et al. Isolation of a Gram-positive poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacterium from compost, and cloning and characterization of a gene encoding PHB depolymerase of *Bacillus megaterium* N-18-25-9. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, n. 2, 2006.

TIRAPELLE, E. F. et al. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. 1997.

URTUVIA, V. et al. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 208–213, 2014.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. **Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications** *Polymer Testing*, 2002.

WANG, X. et al. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1734–1744, 2013.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of bacteriology**,

v. 177, n. 9, p. 2425–35, maio 1995.

WOLF, J. B. W. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: An RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 559–572, 2013.

YAMADA, M. et al. Autoregulator protein PhaR for biosynthesis of polyhydroxybutyrate [P(3HB)] possibly has two separate domains that bind to the target DNA and P(3HB): Functional mapping of amino acid residues responsible for DNA binding. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1118–1127, 2007.

YAMAGUCHI, Y.; PARK, J. H.; INOUE, M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 42, p. 28746–28753, 2009.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. New Insight into the Role of the PhaP Phasin of Ralstonia eutropha in Promoting Synthesis of Polyhydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2394–2397, 1 abr. 2001.

ZHANG, L. et al. Malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase from Helicobacter pylori: Crystal structure and its interaction with acyl carrier protein. **Protein Sci**, v. 16, n. 6, p. 1184–1192, 2007.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n. 1, p. 5–21, 2001.